

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/072848 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82, 15/54, 9/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02492

(22) Internationales Anmeldedatum:

7. März 2002 (07.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

101 11 676.4 9. März 2001 (09.03.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; 06468 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BADUR, Ralf [DE/DE]; Teodor-Storm-Str. B, 67117 Limburgerhof (DE). GEIGER, Michael [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484 Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: DOERPER, Thomas; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EB, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A2

(54) Title: INCREASE IN THE VITAMIN E CONTENT IN ORGANISMS DUE TO AN INCREASE IN THE TYROSINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

WO 02/072848

(54) Bezeichnung: ERHÖHUNG DES VITAMIN-E-GEHALTS IN ORGANISMEN DURCH ERHÖHUNG DER TYROSINA-MINOTRANSFERASE-AKTIVITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing vitamin E by cultivating organisms, especially plants, which have an increased tyrosine aminotransferase activity in relation to the wild type. The invention also relates to the genetically modified organisms, especially plants themselves.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.

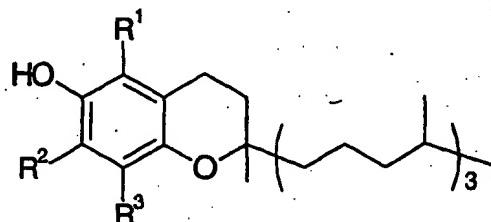
Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die Gruppe der Tocopherole (1a-d) weist eine gesättigte Seitenkette auf, die Gruppe der Tocotrienole (2a-d) eine ungesättigte Seitenkette:

20

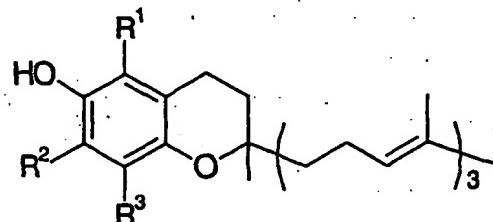


(1)

25

- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
- 1b, β -Tocopherol: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
- 1c, γ -Tocopherol: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
- 30 1d, δ -Tocopherol: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

35



(2)

- 2a, α -Tocotrienol: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
- 40 2b, β -Tocotrienol: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
- 2c, γ -Tocotrienol: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
- 2d, δ -Tocotrienol: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin E alle vorstehend erwähnten Tocopherole und Tocotrienole mit Vitamin-E-Aktivität verstanden.

Diese Verbindungen mit Vitamin-E-Aktivität sind wichtige natürliche fett-lösliche Antioxidantien. Ein Mangel an Vitamin E führt bei Menschen und Tieren zu pathophysiologischen Situationen. Vitamin E-Verbindungen haben daher einen hohen wirtschaftlichen Wert als Zusatzstoffe im Food- und Feed-Bereich, in pharmazeutischen Formulierungen und in kosmetischen Anwendungen.

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Vitamin E-Verbindungen sowie Nahrungs- und Futtermittel mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt sind daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung natürlicher oder durch genetische Veränderung optimierter Vitamin-E-produzierender Organismen.

15

Abbildung 62 zeigt ein Biosyntheseschema von α -Tocopherol in höheren Pflanzen.

In höheren Pflanzen wird Tyrosin ausgehend von Chorismat über Prephenat und Arogenat gebildet. Die aromatische Aminosäure Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosinaminotransferase in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird.

25 Die Homogentisinsäure wird anschließend an Phytylpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocotrienol, das 2-Methyl-6-phytylhydrochinol bzw. das 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinol zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol.

Es sind Versuche bekannt, in transgenen Organismen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene eine Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol- bzw. Tocotrienolgehaltes zu erreichen.

WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

WO 99/04622 bzw. D. DellaPenna et al., Science 1998, 282, 2098-2100 beschreiben Gensequenzen codierend für eine γ -Tocopherolmethyltransferase aus Synechocystis PCC6803 und Arabidopsis thaliana und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherol-biosynthese zur Folge hat.

5 WO 00/08169 beschreibt Gensequenzen codierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und eine Geranyl-Geranyl-Pyro-phosphat Oxidoreduktase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

10 WO 00/68393 und WO 00/63391 beschreiben Gensequenzen codierend eine Phytyl/Prenyl-Transferase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

In WO 00/61771 wird postuliert, daß die Kombination eines Gens
15 aus dem Sterol-Stoffwechsel in Kombination mit einem Gen aus dem Tocopherolstoffwechsel zu einer Erhöhung des Tocopherolgehalts in transgenen Pflanzen führen kann.

In einer von A. Lopoukhina verfassten Doktorarbeit (*Characterization of coronatin regulated genes from Arabidopsis thaliana*, Doktorarbeit an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, 1999) und in einem Posterbeitrag von H. Holländer-Czytko et al. auf der Botanikertagung 2000 in Jena vom 17-22.9.2000 werden durch das Phytotoxin Coronatin induzierbare Gene aus *Arabidopsis thaliana* offenbart. Bei einem dieser Gene weist die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Homologie von ca. 35 % mit bekannten Tyrosinaminotransferasen auf. Durch heterologe Expression des putativen Tyrosinaminotransferase-Gens in *E.coli* konnte eine geringe Enzymaktivität einer Tyrosinamino-transferase nachgewiesen werden. Es wird offenbart, daß die Behandlung von Pflanzen mit Coronatin und die Verwundung von Pflanzen zu einer Akkumulation der putativen Tyrosinamino-transferase-spezifischen mRNA, der putativen Tyrosinamino-transferase und der meßbaren Enzymaktivität führt. Ferner wird auf Seite 72 f. der Doktorarbeit offenbart, daß es bekannt sei, daß die Verwundung von Pflanzen zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, die durch antioxidative Verbindungen wie Tocopherol, Carotinoide oder Rosmarinsäure abgefangen werden.

40 Alle diese Methoden, bis auf den zuletzt erwähnten Stand der Technik, liefern zwar genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen, die in der Regel einen modifizierten Gehalt an Vitamin E aufweisen, weisen jedoch den Nachteil auf, daß die Höhe des Gehalts an Vitamin E in den im Stand der Technik
45 bekannten genetisch veränderten Organismen noch nicht zufriedstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Organismen, die Vitamin E herstellen, zur Verfügung zu stellen, 5 die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Vitamin E aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen. 10

Unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tyrosinaminotransferase verstanden.

15 Unter einer Tyrosinaminotransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Tyrosin in 4-Hydroxyphenylpyruvat umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase umgesetzte Menge Tyrosin bzw. gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat verstanden.
25 Bei einer erhöhten Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase die umgesetzte Menge Tyrosin bzw. die gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat erhöht.

30 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter 35 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tyrosinaminotransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordnbar ist, wird unter Wildtyp für die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen 2-Me-

thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Tocopherolcyclase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität, sowie für die Erhöhung des Gehalts an Vitamin E ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus ist vorzugsweise *Brassica napus* cv Westar.

Die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Protein-
15 ebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Tyrosinaminotransferase-Gens durch Phytotoxine wie beispielsweise Coronatin oder durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus, insbesondere Pflanzen eigenen endogenen Tyrosinaminotransferasen verstanden. Dies kann
25 beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Tyrosinaminotransferasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion
30 von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression mindestens einer endogenen Tyrosinaminotransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch
35 besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Tyrosinaminotransferase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Tyrosinaminotransferase codiert verwendet werden. Bei genomischen Tyrosinaminotransferase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Tyrosinaminotransferase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Beispiele für Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase bzw. Beispiele für Tyrosinaminotransferasen sind

die sechs putativen Tyrosinaminotransferasen TAT I bis TAT VI aus *Arabidopsis thaliana* TAT I: CAA23026 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 5, Protein: SEQ. ID. NO. 6), TAT II: CAA23025, TAT III: AAD23027 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 7, Protein: SEQ. ID. NO. 8), TAT IV: CAA16881, TAT V: AAD21706 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 9, Protein: SEQ. ID. NO. 10), TAT VI: (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 11, Protein: SEQ. ID. NO. 12).

35 die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 1, Protein: SEQ. ID. NO. 2),

eine Variante der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 3, Protein: SEQ. ID. NO. 4),

40

die humane Tyrosinaminotransferase (Accesion No. XP_008081),

45 die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma rangeli* (Accesion No. AF165323_1),

die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma cruzi* (Accession No. AI 622965) oder

die Tyrosinaminotransferase aus *Rhizobium meliloti* (Accession No. L05065).

Bevorzugt verwendet man Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion 10 von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 33 %, bevorzugter mindestens 35 %, bevorzugter mindestens 50%, noch bevorzugter mindestens 70 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische 15 Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* dar.

20 Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei- 25 spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini 30 des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere 35 Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der 40 Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45

Multiple alignment parameter:

Gap penalty

10

8

Gap length penalty	10
Pairwise alignment parameter:	
K-tuple	1
Gap penalty	3
5 Window	5
Diagonals saved	5

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist,
 10 wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

15 Die bekannten Tyrosinaminotransferasen weisen mit der SEQ. ID. NO. 2 (Tyrosinaminotransferasen aus *Rattus norvegicus*) nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz folgende Identität [%] der Aminosäuresequenzen auf:

20 CAA23026 (TAT I)	26,8 %
CAA23025 (TAT II)	22,3 %
AAD23027 (TAT III)	28,3 %
CAA16881 (TAT IV)	29,8 %
AAD21706 (TAT V)	30,0 %
25 TAT VI K19.P17.14	33,3 %
AF165323_1 (<i>Tryposoma rangeli</i>)	33,3 %
XP_008081 (human)	91,6 %

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren
 30 in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* SEQ. ID. NO. 2 oder die Aminosäuresequenz der humanen Tyrosinaminotransferase (Accession No. XP_008081).

35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
 40 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.
 Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die cDNA der Tyrosinamino-
10 transferase aus *Rattus norvegicus* (Accession No. NM_012668) dar.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kulti-
viert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivi-
tät mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
15 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytol-
transferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduk-
tase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-
Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyl-
transferase-Aktivität aufweisen.

20 Unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzy-
maktivität einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase verstanden.

Unter einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase wird ein Protein
25 verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyphe-
nylpyruvat in Homogentisat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Akti-
vität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphe-
nylpyruvat-Dioxygenase umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw.
30 gebildete Menge Homogentisat verstanden.

Bei einer erhöhten Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität ge-
genüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer
35 bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygena-
se die umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw. die gebildete
Menge Homogentisat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dio-
40 xygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens
20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt min-
destens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter
mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxyphe-
nylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität des Wildtyps.

10

Unter Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Phytyltransferase verstanden.

Unter einer Homogentisat-Phytyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat und Phytlypyrophosphat in 2-Methyl-6-Phytlyhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Phytlytransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytlytransferase umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytlypyrophosphat bzw. gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytlyhydrochinol verstanden.

Bei einer erhöhten Homogentisat-Phytlytransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytlytransferase die umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytlypyrophosphat bzw. die gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytlyhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Homogentisat-Phytlytransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Homogentisat-Phytlytransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat in Phytlypyrophosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. gebildete Menge Phytlypyrophosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. die gebildete Menge Phytlypyrophosphat erhöht.

11

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyro-phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch 5 bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität des Wildtyps.

Unter 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität 10 wird die Enzymaktivität einer 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase verstanden.

Unter einer 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 15 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol in 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität die in einer 20 bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase umgesetzte Menge 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol bzw. gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol verstanden.

25 Bei einer erhöhten 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase die umgesetzte Menge 30 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol bzw. die gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität mindestens 35 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

40 Unter Tocopherolcyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tocopherolcyclase verstanden.

Unter einer Tocopherolcyclase wird ein Protein verstanden, das 45 die enzymatische Aktivität aufweist, 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol in γ -Tocopherol umzuwandeln.

12

Dementsprechend wird unter Tocopherolcyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol bzw. gebildete Menge γ -Tocopherol verstanden.

5

Bei einer erhöhten Tocopherolcyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase die umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinol bzw. die gebildete Menge γ -Toco-

10 pherol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, be-
15 vorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tocopherolcyclase-Aktivität des Wildtyps.

Unter γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer γ -Tocopherol-Methyltransferase verstanden.

Unter einer γ -Tocopherol-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Tocopherol in α -Tocopherol umzuwandeln.

25

Dementsprechend wird unter γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein γ -Tocopherol-Methyltransferase umgesetzte Menge γ -Tocopherol bzw. gebildete Menge α -Tocopherol verstanden.

30

Bei einer erhöhten γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein γ -Tocopherol-Methyltransferase die umgesetzte Menge γ -Tocopherol bzw. die gebildete Menge α -Toco-
35 pherol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt min-
40 destens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

Die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-
45 Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxido-reduktase-Aktivität, 2-Me-

13

- thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Protein-ebene oder durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also der Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp.
- 15 mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase
- 20 25 Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens, Homogentisat-Phytoltransferase-Gens, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Gens, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Gens, Tocopherolcyclase-Gens oder γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen mindestens einer der Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytoltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase

oder γ -Tocopherol-Methyltransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen, Homogentisat-Phytoltransferasen, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktasen, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferasen, Tocopherolcyclasen oder γ -Tocopherol-Methyltransferasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytoltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder γ -Tocopherol-Methyltransferase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytoltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder γ -Tocopherol-Methyltransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des Weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-, Homogentisat-Phytoltransferase-, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-, Tocopherolcyclase- oder γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gene dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, im folgenden auch HPPD genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine HPPD in den Organismus.

15

Dazu kann prinzipiell jedes HPPD-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPPD codiert, verwendet werden.

Bei genomicischen HPPD-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPPD zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

10

Beispiele für HPPD-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 13, Protein: Seq. ID. No. 14) oder eine HPPD aus Gerste (WO 99/04021).

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPPD-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPPD oder mindestens zwei endogene Nuk-
20 leinsäuren, codierend eine HPPD auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 14 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Amino-
30 säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPPD aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 14 stellt die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabisopsis thaliana* dar.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder 45 der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 14 leicht auffinden.

16

Die HPPD aus Gerste weist beispielsweise mit der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 14) eine Identität von 57,5% auf.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 13 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 14).

15 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25 Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die HPPD der Sequenz SEQ ID NO. 14 codiert.

Alle vorstehend erwähnten HPPD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren

werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Expression einer Nukleinsäure codierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, im folgenden auch HPT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine HPT in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes HPT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen HPT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für HPT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 15, Protein: Seq. ID. No. 16) oder Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Glycine max*, *Helianthus annus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgaris* oder *Syn echocystis sp. PCC6803*.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine HPT auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPT aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 16 stellt die Aminosäuresequenz der HPT aus *Arabisopsis thaliana* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 16 leicht auffinden.

Die HPT aus *Synechocystis* sp. PCC6803 weist beispielsweise mit der HPT aus *Arabisopsis thaliana* (Seq. ID. No. 16) eine Identität von 40,9 % auf.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 15 aus verschiedensten Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPT aus *Arabidopsois thaliana* (SEQ. ID. NO. 16).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.

Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die HPT der Sequenz SEQ ID NO. 16 codiert.

Alle vorstehend erwähnten HPT-Gene sind weiterhin in an sich bekannte Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, im folgenden auch GGPPOR genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine GGPPOR in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes GGPPOR-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine GGPPOR codiert, verwendet werden.

Bei genomischen GGPPOR-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende GGPPOR zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für GGPPOR-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 17, Protein: Seq. ID. No. 18) oder Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Helianthus annus*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgaris* oder *Synechocystis sp. PCC6803*.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres GGPPOR-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine GGPPOR oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR auf.

20

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren 5 abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer GGPPOR aufweisen.

10

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 18 stellt die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* dar.

15

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

20

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 18 leicht auffinden.

Die GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (Seq. ID. No. 18) eine Identität von 80 % auf:

30

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (SEQ. ID. NO. 18).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhaltlich.

21

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht 5 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 in den Organismus ein.

15 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 stellt die genomische DNA aus Nicotiana tabacum dar, die die GGPPOR der Sequenz SEQ. ID NO. 18 codiert.

Alle vorstehend erwähnten GGPPOR-Gene sind weiterhin in an sich 20 bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode 25 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory 30 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, im folgenden auch MT1 35 genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine MT1 in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes MT1-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine MT1 codiert, verwendet werden.

40

Bei genomischen MT1-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende MT1 zu exprimieren, bevorzugt bei 45 reits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für MT1-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine MT1 aus *Synechocystis sp. PCC6803* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 19, Protein: Seq. ID. No. 20).

5 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres MT1-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine MT1 oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine MT1 auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer MT1 aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 20 stellt die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis sp. PCC6803* dar.

25 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz 30 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der 35 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 20 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich weiterhin beispielweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur 45 Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine ko-

dieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEQ. ID. NO. 20).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
5 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code er-
hältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.

10 Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen
anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht
ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so
15 ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der
Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine
Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 in den Orga-
20 nismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 stellt die genomische DNA aus *Syne-*
chocystis sp. PCC6803 dar, die die MT1 der Sequenz SEQ ID NO. 20
codiert.

25 Alle vorstehend erwähnten MT1-Gene sind weiterhin in an sich be-
kannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteini-
nen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner über-
lappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix
30 herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann
beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode
(Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) er-
folgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüll-
15 len von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase
und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren
werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory
manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ge-
40 nexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tocopherolcyclase,
im folgenden auch CYC genannt, durch Einbringen von mindestens
einer Nukleinsäuren codierend eine CYC in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes CYC-Gen, also jede Nukleinsäure, die
45 eine CYC codiert, verwendet werden.

Bei genomischen CYC-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende CYC zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für CYC-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 21, Protein: Seq. ID. No. 22) oder Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Glycine max*, *Helianthus annus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* oder *Hordeum vulgaris*.

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres CYC-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine CYC oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine CYC auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 22 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, und die die enzymatische Eigenschaft einer CYC aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 22 stellt die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* dar.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz 40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der 45 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 22 leicht auffinden.

25

Die CYC aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* (Seq. ID. No. 22) eine Identität von 29,1 % auf.

5 Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 21 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* (SEQ. ID. NO.

15 22).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht 25 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 in den Organismus ein.

35 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 stellt die genomische DNA aus *Synechocystis sp. PCC6803* dar, die die CYC der Sequenz SEQ ID NO. 22 codiert.

Alle vorstehend erwähnten CYC-Gene sind weiterhin in an sich bekannte Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode 40 45 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllungen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase

und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, im folgenden auch γ -TMT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine γ -TMT in den Organismus.

10 Dazu kann prinzipiell jedes γ -TMT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine γ -TMT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen γ -TMT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen 15 Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende γ -TMT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20 Beispiele für γ -TMT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 23, Protein: Seq. ID. No. 24) oder Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT aus *Glycine max*, *Helianthus annus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgaris* oder *Syn echocystis sp.* PCC6803.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens 30 ein weiteres γ -TMT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine γ -TMT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT auf.

35 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 24 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vor 40 zugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID., NO. 24, und die die enzymatische Eigenschaft einer γ -TMT aufweisen.

45 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 24 stellt die Aminosäuresequenz der γ -TMT aus *Arabisopsis thaliana* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für γ -TMT und γ -TMT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 24 leicht auffinden.

Die γ -TMT aus Synechocystis sp. PCC6803 weist beispielsweise mit der γ -TMT aus Arabisopsis thaliana (Seq. ID. No. 24) eine Identität von 26,7 % auf.

Weitere Beispiele für γ -TMT und γ -TMT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 23 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der γ -TMT aus Arabidopsis thaliana (SEQ. ID. NO. 24).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die γ -TMT der Sequenz SEQ ID NO. 24 codiert.

Alle vorstehend erwähnten γ -TMT-Gene sind weiterhin in an sich bekannte Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode 10 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory 15 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der 20 Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Iso-merase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität auf.

Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmässige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins, beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Enzymaktivität oder eine fehlende immunologische 30 Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.

Unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Dioxygenase verstanden.

35 Unter einer Homogentisat-Dioxygenase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat in Maleylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität 40 die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase umgesetzte Menge Homogentisat bzw. gebildete Menge Maleylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität gegen-45 über dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase die

29

umgesetzte Menge Homogentisat bzw. die gebildete Menge Maleylacetatoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

10 Unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Maleylacetoacetat-Isomerase verstanden.

Unter einer Maleylacetoacetat-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Maleylacetoacetat 15 in Fumarylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. gebildete Menge 20 Fumarylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase die 25 umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. die gebildete Menge Fumarylacetoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 30 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase verstanden.

Unter einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Fumarylacetoacetat in Fumarat umzuwandeln.

40 Dementsprechend wird unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. gebildete Menge Fumarat verstanden.

45

Bei einer reduzierten Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase die umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. die gebildete Menge 5 Fumarat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 10 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Die Homogentisat-Dioxygenase wird im folgenden auch als HGD bezeichnet, die Maleylacetoacetat-Isomerase wird im folgenden auch 15 als MAAI bezeichnet und die Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird wird im folgenden auch als FAAH bezeichnet.

Es zahlreiche Möglichkeiten, um die HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Aktivität in gewünschter Weise zu reduzieren.

20 Eine mögliche Methode umfasst die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz, im folgenden auch anti-HGD, anti-MAAI bzw. anti-FAAH genannt, welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der HGD-, MAAI- und/oder 25 FAAH-Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression von endogener HGD, MAAI und/oder FAAH inhibiert.

Diese anti-HGD, anti-MAAI oder anti-FAAH-Nukleinsäuresequenzen können gemäss einer bevorzugten Ausführungsform die in antisense- 30 Orientierung insertierte kodierende Nukleinsäuresequenz der HGD MAAI und/oder FAAH oder funktional äquivalente Fragment der jeweiligen Sequenzen enthalten.

Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA 35 Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. FEMS Microbiol Rev. 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen.

40 Weitere Methoden zur Reduzierung der HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Expression, insbesondere in Pflanzen als Organismen umfassen die zu Kosuppression führende Überexpression homologer HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Nukleinsäuresequenzen (Jorgensen et al., Plant Mol. Biol. 1996, 31 (5):957-973) oder die Induktion des spezifischen 45 RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionsystems (Amplikon) (Angell, SM et al., Plant J. 1999,

20(3):357-362). Diese Methoden werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet.

Weitere Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in
5 das Endogen mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in
die Pflanze (Zhu et al., Nat. Biotechnol. 2000, 18(5):555-558)
oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B.
T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992,
10 20(5):963-976) oder homologer Rekombination (Hohn, B. und Puchta,
H, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96:8321-8323.). Ferner ist
eine Genüberexpression oder -repression auch mit spezifischen
DNA-bindenden Faktoren z.B. mit den oben erwähnten Faktoren vom
Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Ferner können Fakto-
ren in eine Zelle eingebracht werden, die das Zielprotein selber
15 inhibieren. Die Protein-bindenden Faktoren können z.B. Aptamere
sein (Famulok M, und Mayer G. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;
243:123-36).

Eine weitere Methode zur Reduzierung mindestens einer der vorste-
20 hend beschriebenen Aktivitäten ist die Verwendung von RNA die
einem Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem
Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der
zu reduzierenden Zielsequenz identisch ist. Eine ausführliche Be-
schreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt
25 wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die zusätzlichen Re-
duzierung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der
Gruppe HGD-, MAAI- und FAAH-Aktivität durch Reduzierung der Ge-
30 nexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der
Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase,
Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nuk-
leinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase gegenüber
dem Wildtyp.

35 Eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure,
ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentis-
sat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-
Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hy-
40 drolase gegenüber dem Wildtyp kann, wie vorstehend beschrieben,
bevorzugt durch Verwendung folgender Methoden erreicht werden:

- a) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen;
- 45 b) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit
einem Ribozym-Verfahren

32

- c) Einführung von für homologe HGD-, MAAI und/oder FAAH-kodierende und zu Kosuppression führende Nukleinsäuresequenzen
 - d) Einführung von HGD-, MAAI und/oder FAAH-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukte;
 - 5 e) Einführung von Nonsense-Mutanten von endogenen HGD-, MAAI und/oder FAAH kodierenden Nukleinsäuresequenzen;
 - 10 f) Einführung von Knockout-Mutanten;
 - g) Einführung von zu homologer Rekombination geeigneten Nukleinsäuresequenzen;
 - 15 h) Einführung von RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Ziel-Nukleinsäuresequenz identisch ist.
- 20 Auch eine kombinierte Anwendung der vorstehend beschriebenen Methoden ist denkbar.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-
25 Aktivität auf.

Dies wird besonders bevorzugt dadurch erreicht, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

35 Je nach verwendetem Organismus ist demnach ein unterschiedliches Teilfragment der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase, zu verwenden.

SEQ. ID. No. 25 stellt beispielsweise ein Teilfragment der HGD-
40 codierenden Nukleinsäure aus *Brassica napus* dar, welches, in ein entsprechendes RNAi-Konstrukt integriert, die HGD-Aktivität in *Brassica napus* reduziert.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp

5

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität aufweisen,

15

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität aufweisen,

25

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

30

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen,

35

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

40

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

45

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- 5 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 10 γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogen-15 sat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Geranyl-Ge-20 ranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine 2-Me-25 thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Tocopherol-30 cyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine γ -Tocophe-35 rol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogen-40 sat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyro-phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,
- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 45 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytolhydro-

chinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogen-

tisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

5 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogenti-

sat-Phytoltransferase-Aktivität, und ein Tocopherolcyclase-Akti-

vität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität

aufweisen,

10 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogenti-

sat-Phytoltransferase-Aktivität und eine g-Tocopherol-Methyl-

transferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivi-

tät aufweisen,

15

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogenti-

sat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyro-

phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytolhy-

20 drochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homo-

gentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität,

25 und eine Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Gera-

nanyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, Tocopherolcy-

clase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Ak-

tivität aufweisen,

30 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität,

Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Gera-

nanyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine und eine

g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-

35 Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogenti-

sat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyro-

40 phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytolhy-

drochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcy-

clase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Ak-

tivität aufweisen,

45 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte

Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogenti-

sat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyro-

phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

5

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß prokaryontische
15 Organismen oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen, Moose, Pilze oder Pflanzen, verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch genetische Veränderung Vitamin E herzustellen. Bevorzugte Organismen sind photosynthetisch aktive Organismen, wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, die bereits als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen sind Pflanzen.

25 Bevorzugte Pflanzen sind Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie 30 beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuss- und Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel 35 oder Soja.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Vitamin E wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Organismen bezeichnet,
40 ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von Vitamin E aus den Organismen angeschlossen.

Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie 45 Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren

abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Vitamin E aus der geernteten Biomasse erfolgt 5 in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

10

Die Isolierung von Vitamin E aus Öl-haltigen Pflanzen erfolgt beispielsweise bevorzugt durch chemische Umwandlung und Destillation aus Pflanzenölen oder aus den bei der Desodorierung pflanzlicher Öle anfallenden Wasserdampfdestillate (Dämpfer-15 kondensate).

Weitere Isolierverfahren von Vitamin E aus Dämpferkondensaten sind beispielsweise in DE 31 26 110 A1, EP 171 009 A2, GB 2 145 079, EP 333 472 A2 und WO 94/05650 beschrieben.

20

Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Pflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine 25 Tyrosinaminotransferase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytanyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-35 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

40

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich funktionsell verknüpft eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz 45 aufweist, die mit einem Teil einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist.

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehr als vier Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivitäten, 5 insbesondere um mehr als 4 Aktivitäten im Organismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Organismen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beispielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Organismen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Organismen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verändern in den Organismus einführt. 15

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Organismen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

20 Dementsprechend betrifft die Erfindung insbesondere eine Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, funktionell verknüpft mit einem oder mehreren Regulationssignalen, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, und

a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis F

30 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

35 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

40 C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, und

45 leisten,

D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

umfasst.

25 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierenden Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

30 Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft ist, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor

und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter 5 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatorischer Elementen derart, daß jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

10

Bei der Verwendung von Pflanzen als Organismus enthalten die erfundungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte und Expressionskassetten vorzugsweise eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid, das die Lokalisation in Plastiden gewährleistet.

15

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

20

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), 25 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

30

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor 35 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 40 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des Ziel-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-indu-

41

zierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WQ 93/21334). Promotor können beispielsweise verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-245).

15

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459-467), LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995), Sucrose-Bindeprotein-Promotor (Zitat), 25 das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Der Biosyntheseort von Vitamin E ist in Pflanzen unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierend eine Tyrosinaminotransferase sinnvoll ist. Dies ist jedoch nicht einschränkend, da die Expression auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

35 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft deshalb eine samenspezifische Expression der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression von exogenen Ziel-40 Genen von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Ziel-Gene kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung 45 ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Ziel-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Ziel-Nukleinsäure und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Ziel-Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, 15 Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind insertierte Nukleinsäure-Sequenzen, 20 die ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ziel-Protein-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die 25 Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des Ziel-Proteins in die Chloroplasten vom Ziel-Protein-Teil enzymatisch abgespalten werden.

30 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem 35 Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente 40 mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
45 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTCTCAACTTTCCCTCTCTCACTTTTCCGGCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTTCTCCGCCGCCGCCGTG

TAAGGTCACCGGCGATTCGTCGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGGGA
TCC_BamHI

PTP10

5

KpnI_GGTACCATGGCGTCTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCGCCTCTCAACTTCCCCCTCTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCAACCTCCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTCGTCGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGCTG

10 GATCC_BamHI

PTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
15 CCTCGCCATGGCTCGCCTCTCAACTTCCCCCTCTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCAACCTCCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTCGTCGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGGGG
ATCC_BamHI

20 Ein weiteres Beispiel für ein plastidäres Transitpeptid ist das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana*.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch her-
gestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus
synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen ent-
halten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten
verschiedener Organismen bestehen.

30 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

35 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die 40 Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis

6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog 5 zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

10

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-
schnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder
Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo
Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen
15 und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese,
"primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-
back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können
20 komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung
gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Poly-
adenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen
25 T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens,
insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des
Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984),
835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

30 Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend
beschriebenen Nukleinsäuren kodierend ein Tyrosinaminotransferase
oder der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder
der Tyrosinaminotransferase zur Herstellung von transgenen
Organismen, insbesondere Pflanzen.

35

Vorzugsweise weisen diese transgenen Pflanze gegenüber dem
Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Vitamin E auf.

Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der
40 erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemä-
ßen Nukleinsäurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E
in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu
produzieren.

45

45

Es ist bekannt, daß Pflanzen mit einem hohen Vitamin-E-Gehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Stress aufweisen. Unter abiotischem Stress wird beispielsweise Kälte, Frost, Trockenheit, Hitze und Salz verstanden.

5

Daher betrifft die Erfindung weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur Herstellung transgener Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Stress aufweisen.

10

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können zur Herstellung von Feinchemikalien in transgenen Organismen, vorzugsweise zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Pflanzen verwendet werden.

15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, insbesondere einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können insbesondere bei Pflanzen an sich bekannte Methoden 20 zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzen- geweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die 25 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikro- injektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium 30 vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispiels- weise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, heraus- gegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 35 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans- formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 40 12 (1984), 8711).

Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren ent- haltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäure- konstrukte oder Expressionskassetten.

45

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien 5 kultiviert werden.

Die Expressionskassette kann über die Pflanzen hinaus auch zur Transformation von Bakterien, insbesondere Cyanobakterien, Moosen, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen eingesetzt werden.

10 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Tyrosinaminotransferase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, 15 der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann 20 in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in 25 Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die 30 Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Tyrosinaminotransferase kodierenden Nukleinsäure wird 35 eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" 40 (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) ein- 45 gebaut werden.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. 5 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft daher ferner die Verwendung der vor- 10 stehend beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere der Expressionskassetten zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen oder zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzen- teilen.

15 Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes der Pflanze oder Pflanzenteile an Vitamin E.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch 20 in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen indem man 25 eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt oder eine vorstehend beschriebene Kombination von Nukleinsäurekonstrukten in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

30 Die Erfindung betrifft ferner die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen selbst.

Wie vorstehend erwähnt, weisen die genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen einen erhöhten Gehalt Vitamin E 35 auf.

Die Erhöhung der Tyrosinamintransferase-Aktivität im Organismus zu einem weiteren Effekt. Es wird nicht nur der Gesamt-Vitamin E- Gehalt erhöht sondern es erfolgt zusätzlich eine selektive 40 Erhöhung der Tocotrienole im Vergleich zu den Tocopherolen.

Als Organismen und zur Herstellung von Organismen mit einem erhöhten Gehalt an Feinchemikalien im Vergleich zum Wildtyp werden in einer bevorzugten Ausführungsform, wie vorstehend 45 erwähnt, photosynthetisch aktive Organismen wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, besonders bevorzugt

Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet.

Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren
5 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Bevorzugte Pflanzen sind, wie vorstehend ausgeführt Tagetes,
Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate,
10 Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicacaen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zucker-
rübe, Zuckerrohr, Nuss- und Weinspezies oder Holzgewächse wie
15 beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel oder Soja..

20 Die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen können, können wie vorstehend beschrieben zur Herstellung von Vitamin E verwendet werden.

25 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitamin-E können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

30 Die erfindungsgemäß, genetisch veränderten Pflanzen können ferner zur Herstellung von Vitamin E-haltigen Extrakten verwendet werden.

35 Erhöhung des Gehaltes an Vitamin E bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze, vorzugsweise für die Dauer mindestens einer Pflanzen-
40 generation.

Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Tocopherol verstanden. Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird aber auch insbesondere ein
45 veränderter Gehalt der vorstehend beschriebenen 8 Verbindungen mit Tocopherolaktivität verstanden.

49

Beispielsweise führt das Einbringen eines Tyrosinaminotransferase-Gens in Pflanzen überraschenderweise zu einem besonders erhöhten Anstieg des Gehalts an Tocotrienolen.

5 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenziator der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

15

Beispiel 1
Klonierung des Tyrosinaminotransferase-Gens kodierend die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus*.

20

Die Präparation der RNA aus Rattenleber erfolgte in an sich bekannter Weise wie von S. Kar und BJ. Carr in Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 212(1), 21-6 (*Differential display and cloning of messenger RNAs from the late phase of rat liver regeneration*), beschrieben.

25

Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung des SuperScript II cDNA Synthese Kit (Gibco BRL) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

30

Die Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotransferase wurde mittels *polymerase chain reaction* (PCR) aus *Rattus norvegicus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Tyrosinaminotransferase 5' SEQ.-ID Nr. 3) und eines antisense spezifischen Primers (Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ.-ID Nr. 4) amplifiziert.

35

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

40

- 2 μ l einer *Rattus norvegicus* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP

45

- 1,5 mM Mg(OAc)₂

- 5 μ g Rinderserum-Albumin

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 5' Primer

50

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
 - 15 µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Bio-systems)
 - 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)
- 5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 10 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Schritt 6: 4°C (Warteschleife)
- 15 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/RnTATAsel wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des M13R Primers bestätigt (SEQ. ID. No. 1 und SEQ. ID. NO. 3).
- 20

Beispiel 2

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana*.

25

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 5' SEQ. ID. No. 28) und eines antisense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ. ID. No. 29) amplifiziert.

30

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

35

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

45 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

51

- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
30 Wiederholungen der Schritte 2-4
5 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität 10 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/ATTATA sel wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des M13R bestätigt (Seq. ID. No. 5).

Beispiel 3

15 Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 3 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* 20 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 31) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 30 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol At3Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol Ar3Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 35 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
40 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
30 Wiederholungen der Schritte 2-4
Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

45

52

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AttTATAse3 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und 5 des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 7).

Beispiel 4

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana*.

10

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 32) und eines antisense spezifischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 33) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten 20 war:

- 2 μ l einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 25 - 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15 μ l 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

35

Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

40

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AttTATAse5 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 9).

45

Beispiel 5

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana*.

5 Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 wird mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 34) und eines antisense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 35)

10 amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 15 - 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol At6Tyrosin-Aminotransferase 5' Primer
- 40pmol Ar6Tyrosin-Aminotransferase 3' Primer
- 20 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 25 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATAse6 wird durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 11).

Beispiel 6

40 Klonierung des Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gens, kodierend für die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum*

45 Die DNA kodierend für Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase -Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Nicotiana tabacum* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5': SEQ. ID. NO. 36) und

54

eines antisense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3': SEQ. ID. No. 37) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2 μ l einer *Nicotiana tabacum* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 10 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5' Primer
- 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3' Primer
- 15 μ l 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- 20 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den 25 PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/NtGGPPOR wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 17).

30

Beispiel 7

Klonierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens kodierend für die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*.

35

Die DNA kodierend für das Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 38) und eines antisense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 3': SEQ. ID. Nr. 39) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten 45 war:

- 2 μ l einer *Arabidopsis thaliana* cDNA

55

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5'Primer
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 3'Primer
- 5 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 10 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 15 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPPD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 13).

Beispiel 8

- 25 Klonierung des Homogentisat-Prenyltransferase-Gens kodierend für die Homogentisat-Prenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

- Die DNA kodierend für das Homogentisinsäure-Prenyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AtHomogentisat-Prenyltransferase 5': SEQ. ID. Nr. 40) und eines antisense spezifischen Primers (AtHomogentisat-Prenyltransferase 3': SEQ. ID. Nr. 41) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 35 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 40 - 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 5'Primer
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

56

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
5 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität **10** des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 15).

Beispiel 9

- 15** Klonierung des 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Gens kodierend für die 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803.
- 20** Die DNA kodierend für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 42)
- 25** und eines antisense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 43) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30** Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 35** - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase 5' Primer
- 40pmol 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase 3' Primer
- 40** - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 45** Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)

57

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

5 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/SynMT1 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq ID. No. 19).

10

Beispiel 10

Klonierung des Tocopherolcyclase-Gens (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase-Gen genannt) kodierend für die Tocopherolcyclase (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase genannt) aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

Die DNA kodierend für 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase 5': SEQ. ID. No. 44) und eines antisense spezifischen Primers (2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase 3': SEQ.-ID Nr. 45) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 30 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase 5'Primer
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase 3'Primer
- 15µl 10 x Pfuf-Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfuf-Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

40 Schritt 3: 1 Minute 60°C (Annealing)

Schritt 4: 1,5 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

45 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pCRTop4blunt (Invitrogen) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pCR4topoblunt/SynCyc

wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-20) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 21).

Beispiel 11

5 Klonierung des γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens kodierend für die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis*

10 *thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers ($\text{At}\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 46) und eines antisense spezifischen Primers ($\text{At}\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 47) amplifiziert.

15 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2 μl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 20 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μg Rinderserum-Albumin
- 40pmol $\text{At}\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 5'Primer
- 40pmol $\text{At}\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 3'Primer
- 15 μl 3,3x rTth DNA Polymerase XL Puffer (PE Applied Biosystems)
- 25 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 30 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- 35 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-T_E (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/ $\text{At}\gamma$ TMT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 23).

Beispiel 12

45 Klonierung eines Teilfragmentes des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens kodierend für die Homogentisinsäure-Dioxygenase aus *Brassica napus*.

59

Die DNA kodierend für ein Teilfragmentes das Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Brassica napus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 48) und 5 eines antisense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 3': SEQ. ID. No. 49) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten 10 war:

- 2 μ l einer *Brassica napus* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 15 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 5' Primer
- 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 3' Primer
- 15 μ l 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus-Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- 25 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den 30 PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/*BnHGD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 25).

35 Beispiel 13

Erzeugung des DNA Konstruktes zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die eine reduzierte Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert, 45 dass er den samenspezifischen Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba* (Weschke W., Bassuner R., van Hai N., Czihal A., Bäumlein H., Wobus U. The structure of a *Vicia faba* Vicilin Gene. Bio-

60

chem. Physiol. Pflanzen 183, 233-242 (1988)), und das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. (Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron 5 in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. MGG (1990)), und das Terminationssignal-2 des Octopin-Synthase Gens aus *Agrobakterium tumifaciens* (Gielen et al. 1984) enthält.

10 Das DNA Fragment kodierend für das Teilfragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* wurde als SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/*BnHGD in den mit SmaI geöffneten pSUN2-Pvic-STLS1-ocsT kloniert, nachdem die überstehenden Enden des Fragmentes mit der T4 Polymerase in glatte Enden überführt 15 wurden. Das resultierende Plasmid pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-ocsT wurde mit ScaI verdaut. In diesen linearisierten Vektor wurde erneut das Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* als geglättetes SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/*BnHGD kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die 20 beiden BnHGD-Fragmente in gegenläufiger Orientierung auf beiden Seiten des STLS1 Introns vorhanden sind. Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT (Abbildung 1) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A.thaliana* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 1 beinhaltet den Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure Dioxygenase Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST- 30 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens.

Beispiel 14

35 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans- 40 gener *A.thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (Patent WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia 45 faba* Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) (Bäumlein H., Boerjan W., Nagy I., Bassunner R., van Montagu M., Inzé D., Wobus U. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in-

transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. MGG 225:459-467 (1991)), die Sequenz kodierend für das Chloroplasten-Transitpeptid des *Vicia faba* Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) Gens (Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplasts. Nucleic Acids Res 16(23): 11380. (1988)) und das Terminationssignal des Nopalatin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73.)

10 enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/RnTATase in den pSUN2-USPP-rbcS-nosT kloniert, nachdem 15 dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut wurde. Dadurch wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) erzeugt und somit ein Import der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in die Plastiden gewährleistet.

20

Dieses Plasmid (pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, Abbildung 2) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A.thaliana* Pflanzen verwendet.

25

Fragment A (678Bp) in Abbildung 2 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D 30 (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalatin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 15

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Amino-35 transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

40

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

45

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalatin-Synthase Gens aus *Agrobakterium tumefaciens* (GIELEN, J., de BEUCKELEER,

62

M., SEURINCK, J., DEBROECK, H., de GREVE, H., LEMMERS, M., van MONTAGU, M., SCHELL, J. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846. (1984)) enthält.

5

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase1 als Sal1 Fragment isoliert, und nachdem die Sal1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, 10 nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym Sma1 parcial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT, Abbildung3) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet. 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 3 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B. (1269 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

20

Beispiel 16

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens 35 aus Agrobakterium (Gielen et al. 1984) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase3 als Sal1 Fragment isoliert, und nachdem das Sal1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, 40 nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym Sma1 parcial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2USPP-AtTATase3-nosT, Abbildung 4) wird zur 45 Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

63

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 4 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

Beispiel 17

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
10 menspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 5
aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen
15 Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) ver-
wendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen
Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein
20 et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase
Gens aus Agrobakterium (Gielen et al. 1984) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5
aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/ATTATase5
25 als BamH1 Fragment isoliert, und nachdem das BamH1 Ende mit dem
Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert,
nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial verdaut
wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

30 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-ATTATase5-nosT, Abbildung5) wird zur
Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 5 beinhaltet den Promotor des
"Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389 Bp)
35 kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis*
thaliana und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssi-
gnal des Nopalin-Synthase Gens.

Beispiel 18

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
menspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
45 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 6
aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

64

Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen
5 Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobakterium* (Gielen et al. 1984) enthält.
Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase5
10 als Sall Fragment isoliert, die Sall Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, der mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial wird (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

15 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT, Abbildung6) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 6 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp)
20 kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

Beispiel 19

25 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
30 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotianum tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

35 Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert, das er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., 1986), und das Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält. Der resultierende Vektor heißt puc19-LeB4-nosT.

40 Das DNA Fragment kodierend für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* wurde als KpnI/Sall Fragment in puc19LeB4nosT kloniert, nachdem dieser mit den Restriktionsenzymen KpnI/Sall verdaut wurde.

45

65

Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1 bis 1323 von Seq. ID 7) als SmaI/Hind3 Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem 5 Restriktionsenzym SmaI/Hind3 verdaut wurde. Der daraus resultierende Vektor heißt pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323). Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1319 bis 1509 von Seq. ID 17), nos-Terminationssequenz als Hind3 Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323) 10 eingefügt, nachdem dieser ebenfalls mit Hind3 geschnitten wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT, Abbildung 7) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 7 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und Fragment C kodiert (272Bp) für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens.

20

Beispiel 20

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 30 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1988) und das Terminationssignal-1 des Octopine-Syn-35 thase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPPD als BamH1/Sall Fragment isoliert und nachdem das BamH1 Ende und 40 Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden, in den mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial verdauten Vektor pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 8691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT, Abbildung 8) wird zur Er-45 zeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

66

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 8 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338 Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 21

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal-1 des Nopalinsynthase-Gens aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Homogentisinsäure Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPT als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den SmaI parcial verdauten pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 88691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT, Abbildung 9) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 9 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182 Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 22

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon Methyltransferas aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kon-

trolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen 5 Promotor des LeguminB4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (De-picker et al., 1982)) enthält.

10

Das DNA Fragment kodierend für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid pGEMTe/SynMT1 als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt 15 und in den Sall verdauten pSUN2-Leb4P-IPP-nosT kloniert, dessen Sall Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Durch wird eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase in den Chloroplasten 20 gewährleistet.

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-IPP-SynMT1-nosT, Abbildung 10) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 10 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957 Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und 30 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 23

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle 40 eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (Wo 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen 45 Promotor des Legumin-B4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Ter-

minationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens* (De-picker et al., 1982) enthält.

- Das DNA Fragment kodierend für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-chinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid PGEMTe/SynCyc als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den Sall verdauten pSUN2-LeB4P-IPP-nosT kloniert, dessen Sall Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Dadurch wird eine Translati-onsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochochinol-Zyklase in den Chlo-roplasten gewährleistet. Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4P-IPP-SynCyc-nosT, Abbildung 11) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 11 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100 Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochochinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. und 20 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 24

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *Brassica napus* Pflanzen, die die γ -Tocopherol-Methyltrans-ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezi-fischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Sucrose-Binding-Pro-tein-Gens (SBP-P) (DE 19852195 C2) und die 35s-Terminationsse-quenz des Blumenkohlmosaikvirus (FRANCK, A., GUILLEY, H., JONARD, G., RICHARDS, K., HIRTH, L. Nucleotide sequence of cauliflower mosaik virus DNA. Cell 21: 285-294. (1980)) enthält. Der resul-tierende Vektor heißt puc19-SBPP-35ST.

Das DNA Fragment kodierend für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* wurde als BamH1/Sall Fragment in puc19-SBPP-At γ TMT-35ST kloniert, nachdem dieser mit dem Restrikti-onsenzym BamH1/Sall verdaut wurde.

Mittels PCR wurde die Expressionkassette bestehend aus: SBP-Promotor, γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35ST Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-XbaI 5': SEQ. ID. No. 50) und eines anti-sense spezifischen Primers (35ST-XbaI 3': SEQ. ID. No. 51), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 10 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer puc19-SBPP-At γ TMT-35ST Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 15 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-XbaI 5' Primer
- 40pmol 35ST-XbaI 3' Primer
- 5 μ l 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

- 20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- 25 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)
- 30 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- Das DNA Fragment bestehend aus SBP-Promotor, γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35ST Terminationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/SBPP- γ TMT-35ST als XbaI Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut wurde.

- 35 Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP- γ TMT-35ST, Abbildung 12) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- Fragment A (1788Bp) in Abbildung 12 beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (291Bp) kodiert für den 35s-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 25

- 45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression des Tyrosin-Amino-transferase Gens aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, in Kombination mit der samenspezifi-

70

schen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und gleichzeitig die samenspezifische Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* vermitteln, wurde der Vektor pSUN2-Pvic-
10 BnHGD*-STLS1-αBnHGD*-ocsT und der Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, verwendet.

Aus dem Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, wurde mittels PCR die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, rbcS Transit-
15 peptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-Srf1 5': SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-Srf1 3': SEQ. ID. No. 53), amplifi-ziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert.

20

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50μl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 25 - 1μl des pSUN2-USPP-rbcS-RnTATase-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5μg Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-Srf1 5'Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3'Primer
30 - 5μl 10x Pful Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pful Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 35 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
Schritt 4: 8 Minuten 68°C (Elongation)
40 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, rbcS Transitpeptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos Ter-
minationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-
45 RnTATase-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den

71

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym EcoR5 verdaut wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-rbcS-5 RnATase-nosT, Abbildung 13) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 13 beinhaltet den Promotor des Viciafaba-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-10 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* und Fragment C (198Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.15 Fragment F (678 Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment H (1365 Bp) kodiert für das Tyrosin-Amino-transferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und Fragment I (272Bp) ko-20 diert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobakterium tumifaciens*.

Beispiel 26

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-amino-25 transferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa- menspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Bras- sica napus*

30 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans- gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogen- tisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch 35 unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATAsel-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombi- niert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend 40 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1 Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wurde aus dem Plasmid pSUN2-USPP-At- TATAsel-nosT als EcoR1/SmaI Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wurde mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5 ver- dauten pSUNPvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

72

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AtTA-Tase1-nosT Abbildung 14) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 5 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 14 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-Ls1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
 10 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment G (1269Bp) kodiert für
 15 das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

Beispiel 27

- 20 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*
- 25 zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogen-
 30 tisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als EcoR1/Sma1 Fragment isoliert, das EcoR1 wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5
 40 verdauten pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AtTA-Tase3-nosT Abbildung 15) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 15 beinhaltet den Promotor des Viciafaba-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment G (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

Beispiel 28

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin- Amino-transferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5 verdaulichen pSUNPvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 16) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 16 beinhaltet den Promotor des Viciafaba-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
5 Synthase Gens.

Beispiel 29

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
10 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
15 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogen-
tisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT und
20 der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5 verdaulaten pSUNPvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT kloniert.

30 Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT/USPP-AtTA-
Tase6-nosT Abbildung 17) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 17 beinhaltet den Promotor des
35 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-
LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
40 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.
Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
45 Synthase-Gens.

Beispiel 30

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphat-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren,
10 werden die Vektoren pSUN2-LEB4-NtGGPPOR-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATasel-nosT miteinander kombiniert.
- 15 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit Xhol verdaulichen Vektor
pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen Xhol Enden zuvor mit
20 dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT Abbildung 18) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 18 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert
30 für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens aus *A. tumefaciens*.
Fragment E (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens..

Beispiel 31

- 40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

76

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxido-
5 reductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren,
werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
10 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tasel-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XbaI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XbaI Enden zuvor mit
15 dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtTATasel-nosT Abbildung 19) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

20 Fragment A (678Bp) in Abbildung 19 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens.

30 Beispiel 32

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxido-
40 reductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren,
werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase3-nosT miteinander kombiniert.

45 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-

Tase3-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Xhol verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen Xhol Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

5

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 20) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

10 Fragment A (678Bp) in Abbildung 20 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und. Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

20 Beispiel 33

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Xhol verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen Xhol Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 21) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 21 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens

10

Beispiel 34

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

25

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XbaI verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XbaI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 22) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 22 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens

Beispiel 35

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 10 aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATasel-nosT miteinander kombiniert.

15 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdauten Vektor pSUN2-USPP-20 AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT Abbildung 23) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 23 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert 30 für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens aus *A.tumefaciens*. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1338Bp) kodiert für das 35 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 36

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus 5 *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend 10 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

15 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 24) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet
Fragment A (678Bp) in Abbildung 24 beinhaltet den Promotor des 20 Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia 25 faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 37

30 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

35 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 40 aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend 45 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 25) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 25 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B 10 (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate- 15 Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 38

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa- 20 menspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifi-schen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans- 25 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden 30 die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA- 35 Tase5-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-SBPP-AtTyTMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 26) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 26 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) 45 kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den

82

Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

5

Beispiel 39

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

20

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 27) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 27 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 40

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus

Arabidopsis thaliana unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-
10 rbcS-RnTATasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-USPP-
15 AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT Abbildung 28) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 28 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodierend für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-
25 Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopine-Synthase Gens.

35 Beispiel 41

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
menspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytoltrans-
ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezi-
40 fischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden

die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 29) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15

Fragment A (678Bp) in Abbildung 29 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

25

Beispiel 42

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

30

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

40

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 30) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 30 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopinsynthase Gens.

15 Beispiel 43

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 31) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

40 Fragment A (678Bp) in Abbildung 31 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-

Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 44

5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

10

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytoltransfe-

15

rase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis*

20

thaliana und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

25

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 32) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 32 beinhaltet den Promotor des

30

"Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment 35 E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 45

40

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis sp. PCC6803* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

45

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Me-

5 thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotrans-
10 ferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

15 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT Abbildung 33) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 33 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-
25 lin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 46

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
35 transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Me-thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und 2-Me-thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.
45 PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren

pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 34) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 34 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytlylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

20

Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

25

Beispiel 47

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytlylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

30

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytlylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

35

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird

89

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 35) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 35 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das 10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytlydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des 15 "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

20 Beispiel 48

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytlydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.

25 PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen 30 Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytlydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

35

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit 40 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 36) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 36 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

5 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens

Beispiel 49

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-15 transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

20 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren 25 pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend 30 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

35 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 37) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

40 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 37 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

45 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp)

91

kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

5 Beispiel 50

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezi-fischen Promotors und 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezi-

10 schen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezi-fischen

15 Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezi-fischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pCR4topo-blunt-USPP-rbcS-RnTATasel-nosT miteinander kombiniert.

20 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotrans-ferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als Srf1 Frag-ment isoliert und in den mit EcoR1 verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls **25** aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT Abbildung 38) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

30 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 38 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-rase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-tanylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Frag-**35** ment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Un-know-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxy-lase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das **40** Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 51

45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-menspezi-fischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoqui-

nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zy-
klase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und
10 pSUN2-USPP-AtTATasel1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-
15 Tasel1-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden.

20 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATasel1-nosT Abbildung 39) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 39 beinhaltet den Promotor des
25 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-
rase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-
tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Frag-
ment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
30 Synthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP)aus *Vicia faba*, Fragment F (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Ara-
bidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminati-
onssignal des Nopalin-Synthase Gens.

35

Beispiel 52

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
menspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoqui-
40 nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-
45 Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimie-

ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 40) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 40 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase- Gens. Fragment E(678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

Beispiel 53

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino- transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdauten Vektor

pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 41) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 41 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das 10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des 15 "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

20 Beispiel 54

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines 25 samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen 30 Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdaulichen 40 Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 42) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 42 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 55

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino- transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 20 aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol- Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTAsel-nosT miteinander kombiniert.

25 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTAsel-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdaulten Vektor pSUN2-SBPP- At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-rbcS-RnTAsel-nosT Abbildung 43) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

35 Fragment A (678Bp) in Abbildung 43 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert 40 für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*. Fragment E (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment G (291Bp) kodiert 45 für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

Beispiel 56

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol Methyltransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 10 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATasel-nosT mit-einander kombiniert.

15

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATasel-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit 20 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdaulichen Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATasel-nosT Abbildung 44) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen 25 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 44 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus 30 *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus 35 *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 57

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-40 menspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 45 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol- Methyltransferase aus

Arabidopsis thaliana samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor
10 pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 45) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 45 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminatorssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

- 25 Beispiel 58
Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase 30 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 35 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol- Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

- 40 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit 45 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 46) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 46 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
 10 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

15 Beispiel 59

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

20 Promotors
 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol- Methyltransferase aus
 25 *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
 30 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit Srf1 verdaulichen Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

35

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 47) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

40 Fragment A (678Bp) in Abbildung 47 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
 45 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis*

99

thaliana, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 60

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der
- 15 endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1 5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1 3' SEQ. ID. No.
- 25 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert.

Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT
Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 35 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-Srf1 5' Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3' Primer
- 5 μ l 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

- 40 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

- 45 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

100

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-
 5 Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdauten pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

10 Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/
 LeB4-NtGGPPOR-nosT Abbildung 48) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 48 beinhaltet den Promotor des
 15 Viciafaba-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp)
 20 kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.
 Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens
 25 Synthase-Gens

Beispiel 61

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
 30 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 35 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-
 40 AtHPPD-ocsT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*
 45 und ocs-Terminationssequenz-1, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 52) und eines anti-sense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 55), am-

101

plifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AtHPPD-ocsT.

5 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1µl einer pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT Plasmid-DNA
- 10 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3'Primer
- 5µl 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 15 - 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

20 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

25 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPPD-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdaulten Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT kloniert.

30

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT/USPP-AtHPPD-ocsT Abbildung 49) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

35 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 49 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B

40 jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

Fragment F (678Bp) kodiert beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*.

45 Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase.

Beispiel 62

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT (siehe nachstehend) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5' SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 55), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert.

25 Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 30 - 1 μ l einer pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5' Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3' Primer
- 35 - 5 μ l 10x Pfu1 DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu1 DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 40 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

103

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, der Homogentisin-säure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPT-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdaulten Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AthHPT-ocsT Abbildung 50) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

10

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 50 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-

15

LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1182Bp) kodiert für das 20 Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 63

25

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisin-säure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

30

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMt1-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

40

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol-Methyltransferase aus *Synechocystis spec PC6808* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1-5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt

104

(Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topo-blunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 10 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-SRF1 5' Primer
- 40pmol nosT-SRF1 3' Primer
- 5 μ l 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94° (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°
- Schritt 3: 1 Minute 55° (Annealing)
- 20 Schritt 4: 10 Minuten 68° (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72° (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodier-
25 end für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB4-IPP-SynMT1-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den
30 mit EcoR5 verdaulichen Vektor pSUN2-ic-*nHGD-STLS1- α *nHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*nHGD-STLS1- α *nHGD-ocsT/USPP-LeB4-IPP-SynMT1-nosT Abbildung 51) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 51 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltrans-

105

ferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) ko-diert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 64

5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*

10

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression 15 der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynCyc-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Iso-merase-2 (IPP-2), der 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 und nos-Terminationssequenz, unter 25 Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-EcoR5-5': SEQ. ID. No. 56) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-EcoR5-3': SEQ. ID. No. 57), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMt1-nosT

30

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50μl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

35 - 1μl einer pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT Plasmid-DNA
 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
 - 5μg Rinderserum-Albumin
 - 40pmol LeB4-EcoR5 5'Primer
 - 40pmol nosT-EcoR5 3'Primer

40 - 5μl 10x Pfuf DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
 - 5U Pfuf DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

45 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

106

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodier-
 5 end für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spe-
 zifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der
 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp.
 PCC6803 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TO-
 Poblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in
 10 den mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-
 ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT/LeB-IPP-Syn-
 Cyc-nosT Abbildung 52) wird zur Erzeugung transgener *Brassica na-*
 15 *pus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 52 beinhaltet den Promotor des
 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-
 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica*
 20 *napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-
 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment
 E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin Gens.
 Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens
 25 aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid
 der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H
 (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytanylplastoquinol Zy-
 klase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) ko-
 diert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens.

30

Beispiel 65

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der γ-Tocopherol Me-
 thyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrük-
 35 kung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus
Brassica napus.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die γ-Tocopherol Methyltrans-
 40 ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezi-
 fischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen
 Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezi-
 fisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-SBPP-
 γTMT-35sT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT mitein-
 45 ander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 58) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-SBPP- γ TMT-35sT.

10 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer pSUN2-SBPP- γ TMT-35sT Plasmid-DNA
- 15 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-SRF1 5' Primer
- 40pmol 35sT-SRF1 3' Primer
- 5 μ l 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 20 - 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

25 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

30 Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der γ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos- Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/SBPP- γ TMT-35sT als Srf1

35 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdaulten Vektor

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/SBPP- γ TMT-35sT Abbildung 53) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 53 beinhaltet den Promotor des Viciafaba-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für einen Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-

45

LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment H (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

Beispiel 66

10 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

15 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-NtGGPPOR-nosT und pCR4topo-blunt-USPP-AtHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPPD-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert.

30 Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtHPPD-ocsT Abbildung 54) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 54 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopaline-Synthase-Gens.

Beispiel 67

45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisin-säure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyro-

109

phosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytol-
transferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samen-
spezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyro-
phosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen
exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und
10 pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Homogentisinsäure-
Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs Terminations-
sequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOBlunt/USPP-AtHPT-ocsT als
15 Srf1 Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor
pSUN2-LeB-NtGGPPOR-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT Abbil-
dung 55) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen
20 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 55 beinhaltet den Promotor des
"Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182Bp)
kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus Ara-
25 bidopsis thaliana. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminati-
onssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) bein-
haltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E
(1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduk-
tase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das
30 Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 68

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpy-
ruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
35 samenspezifischen Promotors, der 2-Me-
thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -To-
copherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kon-
trolle eines samenspezifischen Promotors

40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-
Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samen-
spezifischen Promotors exprimieren, 2-Me-
45 thyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors expri-
mieren und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

110

unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT35ST und pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-AtHPPDocST miteinander kombiniert.

5

- Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPPD-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdauten Vektor 10 pSUN2-SBPP-At γ TMT 35ST kloniert, der zuvor ebenfalls mit dem Restriktionenzym Srf1 verdaut wird. In das entstandene Plasmid pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/ USPP-AtHPPD-ocsT, wird das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* 15 PC6808 und nos-Terminationssequenz aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/ LeB-SynMT1-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Xhol verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT35sT/USPP-AtHPPD-ocsT kloniert, nachdem die Xhol Enden aufgefüllt wurden.
- 20 Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-At γ TMT35sT/USPP-AtHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT Abbildung 56) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (1788Bp) in Abbildung 56 beinhaltet den Promotor des 25 SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das 30 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment H (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment I (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp. PCC6803*. Fragment J (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase-Gens.

40 Beispiel 69

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* 45 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

111

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytolhydroquinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors werden und pSUN2-USPP-AtHPPDocST und der Vektor pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT miteinander kombiniert.

- 10 Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB-SynMT1-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit XbaI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert, dessen
15 XbaI Enden aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT Abbildung 57) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 20 Fragment A (678Bp) in Abbildung 57 beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationsignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-2. Fragment F (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytolhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationsignal des Nopalatin-Synthase-Gens.

Beispiel 70

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, die Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytoltransferase aus *Arabidop-*

112

sis thaliana samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-AtHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPPD-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit Xhol verdaulden Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT kloniert, nachdem die 10 Xhol Enden zuvor mit der Klenow Polymerase geglättet werden. Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 58) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 58 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet 20 den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytoltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia 25 faba*, Fragment H (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens:
- 30 Beispiel 71
Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytolhydroquinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec 35 PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.
- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
40 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytolhydroquinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec PC6808* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

113

werden die Konstrukte pSUN2-SBPP-At γ TMT35ST/USPP-AtHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT verwendet.

Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis spec PC6808* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in den mit Srf1 ver-dauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35ST/USPP-AtHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym Srf1 verdaut wird. Dadurch wird die Expressionkassette bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dehydrogenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationsequenz gegen die Expressionkassette bestehend aus LeB-Promotor, die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zyklase-Gen aus *Synechocystis spec PC6808* und nos-Terminationssequenz, ausgetauscht.

Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-At γ TMT35sT/LeB-IPP-SynCyc-nosT/LeB-IPP-SynMT1-nosT Abbildung59) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (1788Bp) in Abbildung 59 beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment F (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis sp. PCC6803*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase- Gens. Fragment H (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment I (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment J (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytyldrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp. PCC6803*. Fragment K (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

Beispiel 72

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *A.thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *B.napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No. 1) unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

wurde ein Derivat des Vektors pGPTVkan (D. Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197, 1992) verwendet.

- 5 Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., *Nuc. Acid. Res.*, 14(6):2707-2720, 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A. thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das
 10 Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-73, 1982) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment in den pPTVkan-
 15 LeP-IPPTP11 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut und die Enden des linearisierten Plasmides mit dem Klenow Enzym in glatte Enden überführt wurden. Dadurch wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der Tyrosin-Aminotransferase in die Plastiden
 20 gewährleistet. Dieses Plasmid pPTVkan-IPPTP11-TATaseRNnos (oder auch pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nosT bezeichnet, Abbildung 60) wurde zur Erzeugung transgener *Brassica Napus* bzw. *A. thaliana* Pflanzen verwendet.

- 25 Fragment A (2764 bp) in Abbildung 60 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1377 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für
 30 das Terminationssignal des Nopalins-Synthase Gens.

Beispiel 73

Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*

Transgene *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden erzeugt, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No. 1) unter Kontrolle des konstitutiven
 40 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980) exprimieren.

Die Grundlage des zur konstitutiven Expression der Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* erzeugten Plasmides war der
 45 pBinAR-IPP-Tp-10 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen und Willmitzer, *Plant Sci.* 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-

115

Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980), das Terminations-signal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) und die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht). Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in diesen Vektor, erzeugt eine Translationsfusion der Tyrosin-Aminotransferase mit dem plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein Transport des Transgens in die Plastiden.

zur Erstellung dieses Plasmides wurde das Tyrosin-Aminotransferase-Gen unter Verwendung der flankierenden EcoRV Restriktions-schnittstellen aus dem Plasmid pGEM-T/Tyrosin-Aminotransferase isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen SmaI geschnittenen pBinAR-IPP-Tp-10 ligiert (siehe Abbildung 61) Dieses Plasmid pBinAR-IPP-Tp-10/Tyrosin-Aminotransferase (oder auch pBinAr-35sP-IPP-RnTATase-nosT bezeichnet) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* und *A.thaliana* Pflanzen verwendet.

Fragment A (529 bp) in Abbildung 61 beinhaltet den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2, Fragment C (1377 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen-1 aus *Rattus norvegicus*, Fragment D (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 74

30 Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) werden mit dem *Agrabacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vacuumfiltrationsmethode transformiert (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pellier, G., in: Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CRAcad Sci Paris, 1993, 40 1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen werden im Vorfeld mit den vorstehend beschriebenen DNA Konstrukten transformiert.

Samen der Primärtransformanden werden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge

116

wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

Beispiel 75

5 Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO₄.) werden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft.
10 und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen werden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wird für die Transformation eingesetzt.

15

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur werden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wird nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze werden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter werden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm² große Stücke geschnitten. Die Agröbakterienkultur wird in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke werden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium 25 in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berühren. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C werden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium muß alle 7-10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bilden, wurden die Explantate 30 in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphtylessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat tritt Organogenese ein und die gebildeten Sprosse können 35 abgeschnitten werden. Die Kultivierung der Sprosse wird auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt.
Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen bildet, können die Pflanzen in Pikiererde getopft werden.

40

Beispiel 76

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen.

Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientiert sich an einem 45 Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual,

Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformationen erfolgt mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Zur Transformation wird das DNA Konstrukt welches eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet (Abbildung 60). Darüberhinaus werden Konstrukt welche eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet, die in den Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 beschrieben sind. Samen von *Brassica napus* var. Westar werden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen werden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) werden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate werden 30 Minuten mit 50 ml Basalmittel gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium werden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

Vom *Agrobacterium* Stamm wird eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wird das Zellpellet in 25 ml Basalmittel resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wird durch Zugabe von weiterem Basalmittel auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wird das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobakterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wird entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wird für 24 h auf einem Rotationschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wird durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min

118

gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wird in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration werden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthalten. Die Petrischalen werden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage werden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit 10 Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen werden wie von Bäde, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

15 Beispiel 77

a) Charakterisierung der transgenen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der 20 mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*) werden analysiert. Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. 25 In Blättern und Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt.

Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der daran 30 anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparatur durch dreimalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.

35 Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Alliance 40 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30^(R), Fa. Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszens der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm) 45 die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

In allen Fällen war die Tocopherol- und oder Tocotrienol-Konzentration in transgenen Pflanzen, im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöht.

5 b) Charakterisierung der transgenen *Brassica napus* Pflanzen.

Um zu veranschaulichen, daß durch die Expression des Tyrosin-Aminotransferase-Gens aus *Rattus norvegicus*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-
10 Gens 3 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 aus *Arabidopsis thaliana* oder Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 aus *Arabidopsis thaliana* alleine oder in Kombination mit zumindest einem weiteren Gen ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenyl-Pyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Homogentisinsäure-
15 Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Geranylgeranyl-pyrophosphat-Oxidorektase-Gen aus *Nicotiana tabacum*, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastochinol-Zyklase-Gen *Synechocystis* sp. PCC6803, γ -Tocopherol-methyltransferase-Gen aus
20 *Arabidopsis thaliana* und der Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens, der Vitamin E-gehalt in Pflanzen erhöht wird, werden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in den Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Brassica napus*) analysiert.

25

Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und auf Northern-Ebene analysiert. In Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt analog Beispiel 77 a) ermittelt.

30

Beispiel 78

Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

35 Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vakuuminfiltrationsmethode transformiert (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J 40 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pellier, G., in: Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CRAcad Sci Paris, 1993, 1144(2):204-212).

45 Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nosT (Beispiel 73, Abbildung 61) und pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nosT (Beispiel 72, Ab-

120

bildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

5 Samen der Primärtransformanden wurden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

10 Beispiel 79

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an 15 einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

20 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit dem Plasmid pPTVkan-LeB4-IPP-RnTA-Tase-nosT (Beispiel 72, Abbildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70% Ethanol (v/v). oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser ge- 30 waschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von 35 mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktions- 40 medium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

Vom *Agrobacterium* Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in 45 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml

121

Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

- 5 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobakterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobakterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 10 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Wasch- 15 medium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20 bis 30 Explante in 90 mm 20 Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit 25 Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

30

Beispiel 80

Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- 35 Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO₄) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in 40 frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation eingesetzt.

Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld 45 mit dem Plasmid pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nosT (Beispiel 73, Abbildung 61) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci.

122

1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20),
9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative
5 Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze
abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Ein-
weckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf der
Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die
Blätter wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm² große Stücke
10 geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petri-
schale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz
durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-
Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das
Medium berührten.

15

Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf
Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klima-
kammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte alle 7 bis 10 Tage
gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten, wurden die
20 Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium
mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose,
0,02 mg/l Naphthylessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure,
0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin)
überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese ein und die
25 gebildeten Sprosse konnten abgeschnitten werden.

Die Kultivierung der Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan
und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger
Wurzelballen gebildet hatte, konnten die Pflanzen in Pikiererde
30 getopft werden.

Beispiel 81

Charakterisierung der transgenen Pflanzen aus Beispiel 78, 79 und
80

35

Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der
mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen aus
Beispiel 78, 79 und 80 (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und
Nicotiana tabacum) werden analysiert. Dazu wurden die transgenen
40 Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen
kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus*
exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen
dieser Pflanzen wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolge-
halt ermittelt.

45

Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der daran anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparatur durch dreimalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 5 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.

Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

10

Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Allience 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30^(R), Fa. Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszens der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm) die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszensdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

20

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* in 16 Linien (Linie 1 bis 24) der transgenen *Nicotiana tabacum*, hergestellt nach Beispiel 80 im Vergleich zum Wildtyp (WT, 4 Replikanten). Dargestellt in der zweiten Spalte ist der Gehalt an Vitamin E (Gesamtgehalt = Summe aller 8 Isomere) in jungem Blattmaterial in [µg/gFW]. In der dritten Spalte ist der Tocotrienol-Anteil der jeweiligen Linie am Gesamtgehalt Vitamin E in [Gew.-%] angegeben.

30 Tabelle 1

Linie transgener <i>Nicotiana tabacum</i> - Pflanzen aus Beispiel 80	Gesamtgehalt Vitamin E in [µg/gFW]	Anteil Tocotrienole in [Gew.-%] bezogen auf den Gesamtgehalt
1	9,13	48,5
2	2,95	4,6
3	5,94	49,5
4	7,24	5,8
6	5,97	7,6
7	8,02	6,4
9	16,26	53,1
10	8,95	41,3
11	13,28	51,6
16	8,96	42,9
17	3,99	3,2
18	10,58	51,7
19	7,57	41,3
24	14,76	56,7
WT n=4	5,4 +/- 0,5	4,75 +/- 2,4

124

Abbildung 63 zeigt grafisch das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus Rattus norvegicus in Nicotiana tabacum (Beispiel 80) im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Gehalte an Vitamin E (Summe aller 8 Isomere) in jungem Blattmaterial. Die Achsenbeschriftung kennzeichnet die einzelnen transgenen Linien. Die dargestellten Werte bei den Wildtyp-pflanzen (wt) entsprechen dem Mittelwert +/- SD von 4 Replikaten.

10**15****20****25****30****35****40****45**

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase; Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren

126

kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nuklein-säuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phyt-yltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus ein-bringt.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekenn-zeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur zusätzlichen Reduzierung mindestens einer der Aktivitä-tten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausge-wählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogenti-sat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoace-tat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylaceto-a-cetat-Hydrolase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- 20 11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organis-mus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxy-genase identisch ist.
- 30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekenn-zeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und die Vitamin-E-Verbindungen anschließend aus dem Organismus isoliert.
- 5 15. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 10 16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 15 17. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15 oder 16 dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase ein Nukleinsäuren verwendet, die Proteine kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweist.
- 20 25 18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 30 19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, enthaltend zusätzlich eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid.
- 35 20. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 19, enthaltend zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 40 45

128

21. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 20, enthaltend zusätzlich funktionell verknüpft eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist.
- 5
22. Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 und
- 10
- a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis F
- 15
- A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 20
- B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und
- 25
- C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 30
- D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
- 35
- E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und
- 40
- F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,
- 45

129

die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

5

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

10

umfasst.

23. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren und einen oder mehrere Terminatoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

15

24. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

20

25

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Tyrosinaminotransferase gegenüber einem Wildtyp erhöht.

30

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

35

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.

40

28. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

45

29. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase enthält.
- 5
30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytoltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.
- 10
- 15
31. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
32. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytoltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon-Methyltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Tocopherolcyclase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase oder

131

zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, enthält.

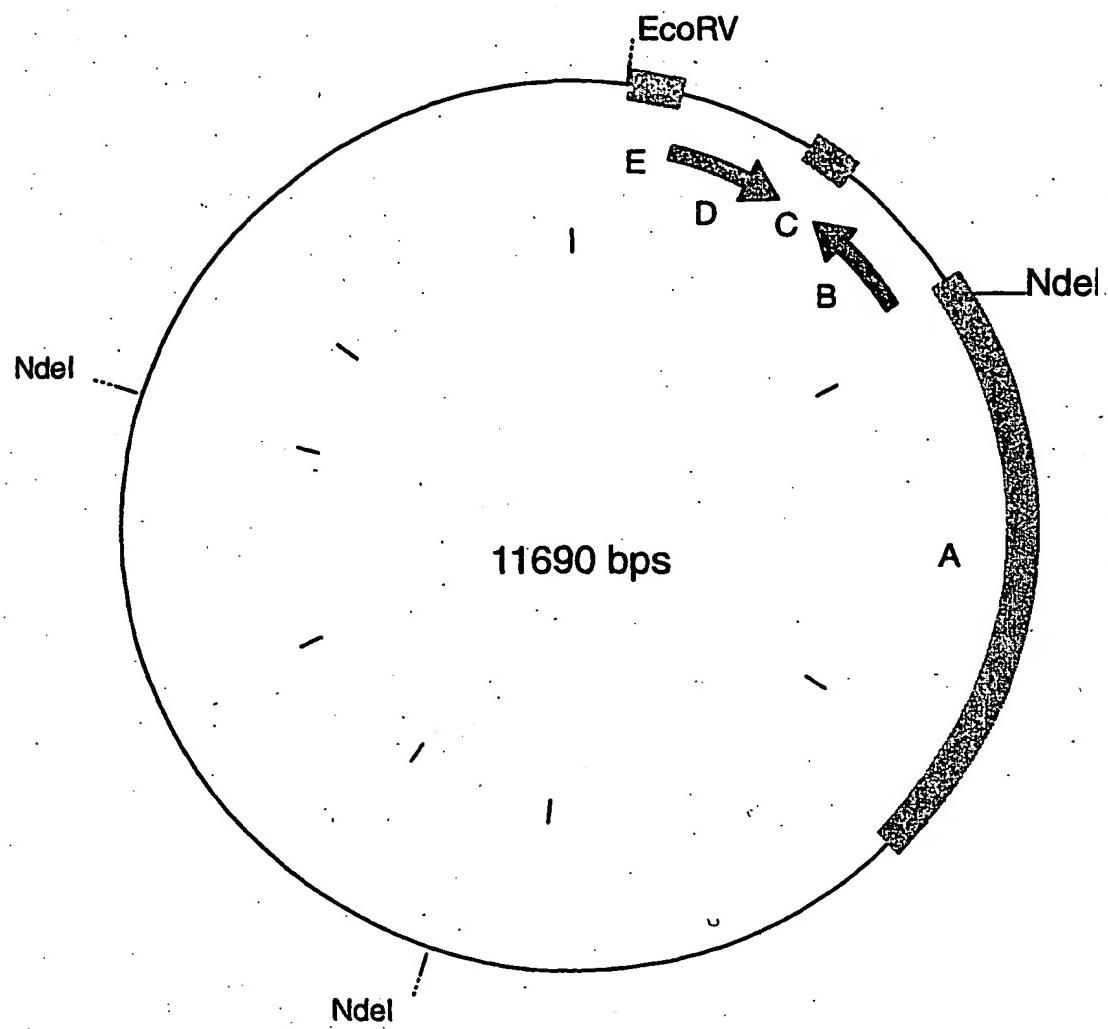
33. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe, Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp reduziert.
10
34. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
15
35. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist.
20
36. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 35, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
25
37. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Vitamin E.
30
38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- und Nahrungsmittel, zur Herstellung von prozessierten Lebensmittel, zur Herstellung von Vitamin E-haltigen Extrakten der Organismen oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
35
39. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 oder Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.
40
- 45

132

40. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 oder der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder der Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu produzieren.

10**15****20****25****30****35****40****45**

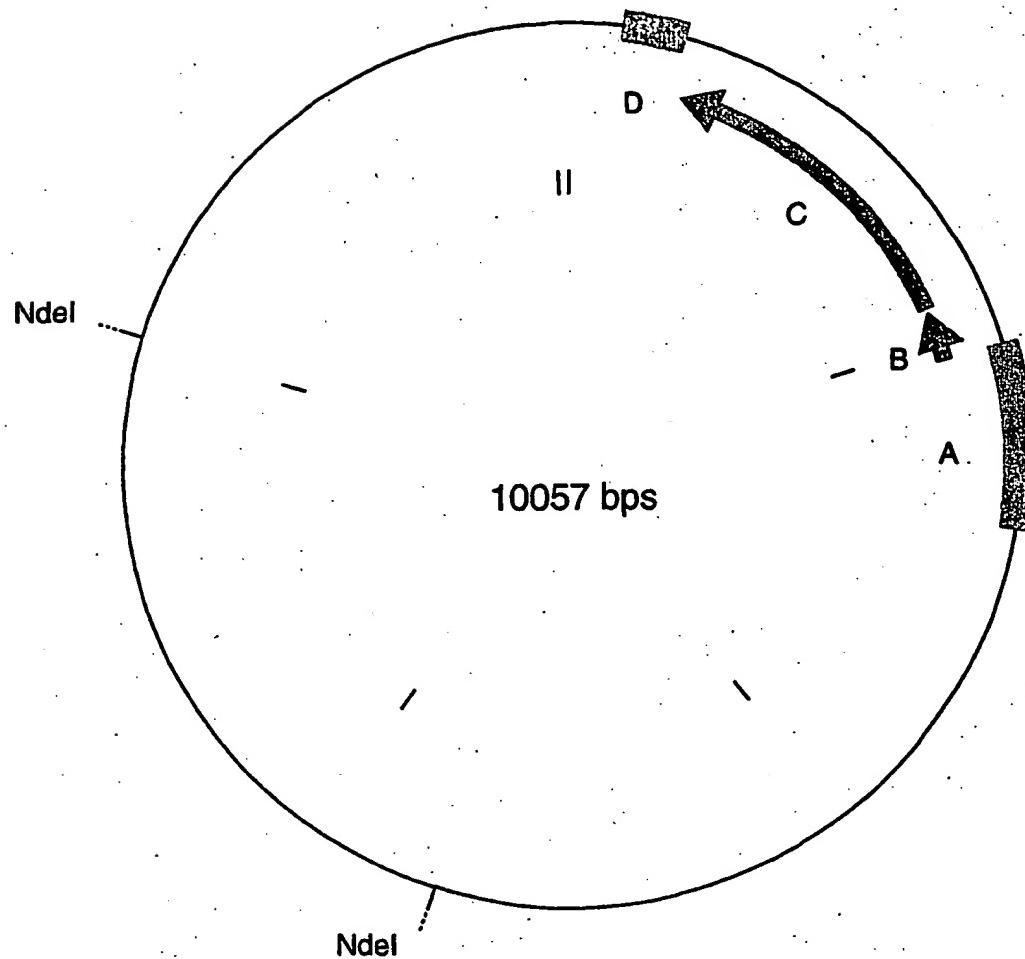
Abbildung 1:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST

2/63

Abbildung 2:

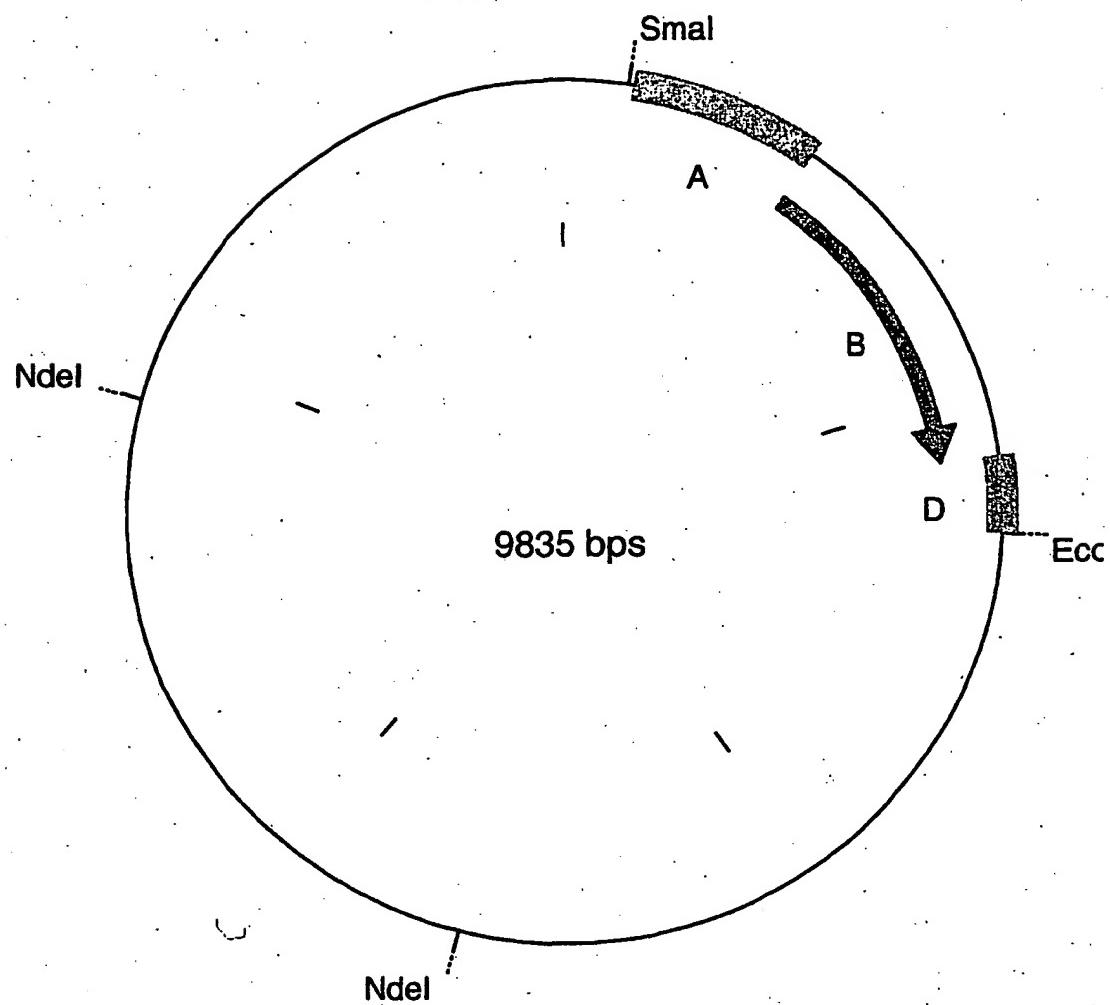
pSUN2-USPP-rbcS-RnTATAse-nosT



3/63

Abbildung 3:

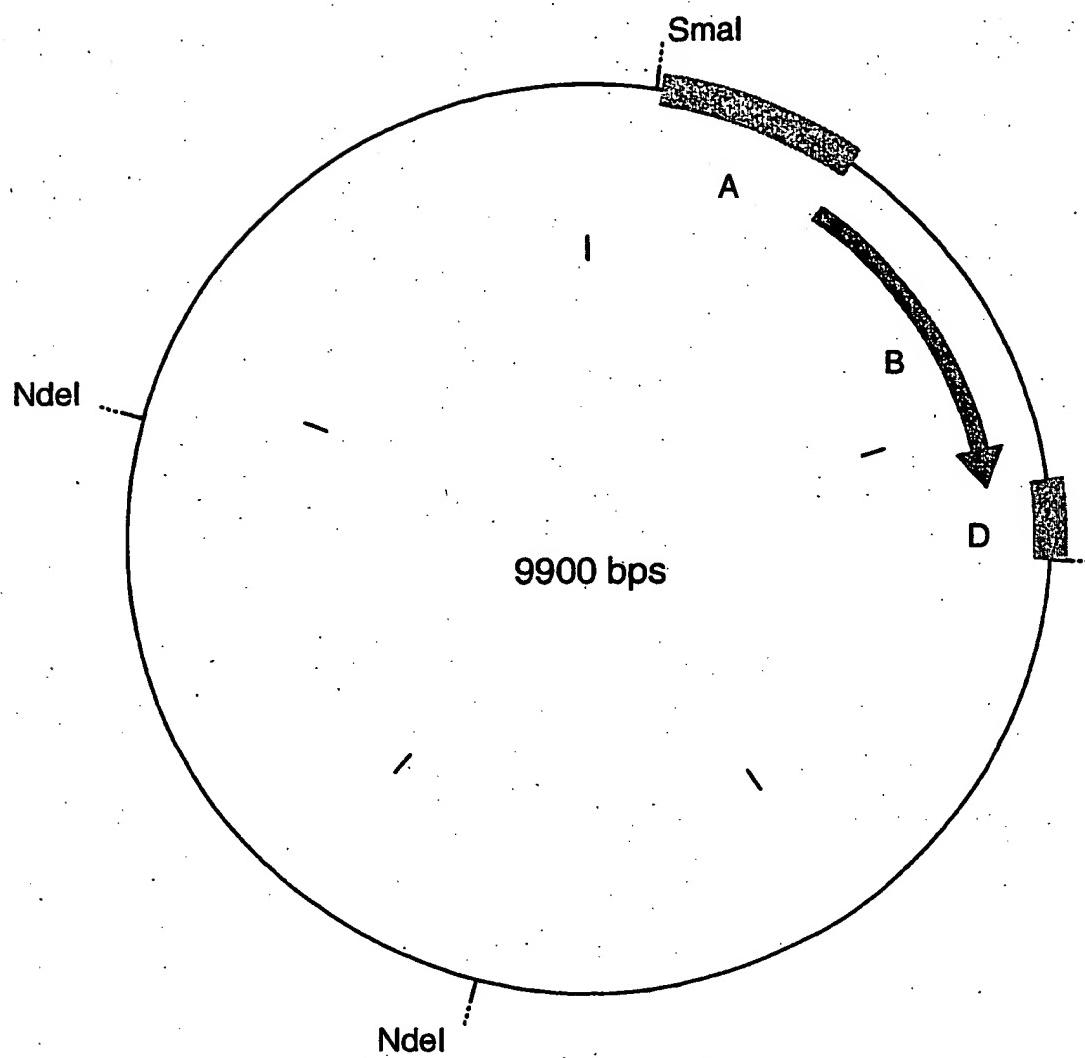
pSUN2-USPP-AtTAtase1-nosT



4/63

Abbildung 4:

pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT



5/63

Abbildung 5:

pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT

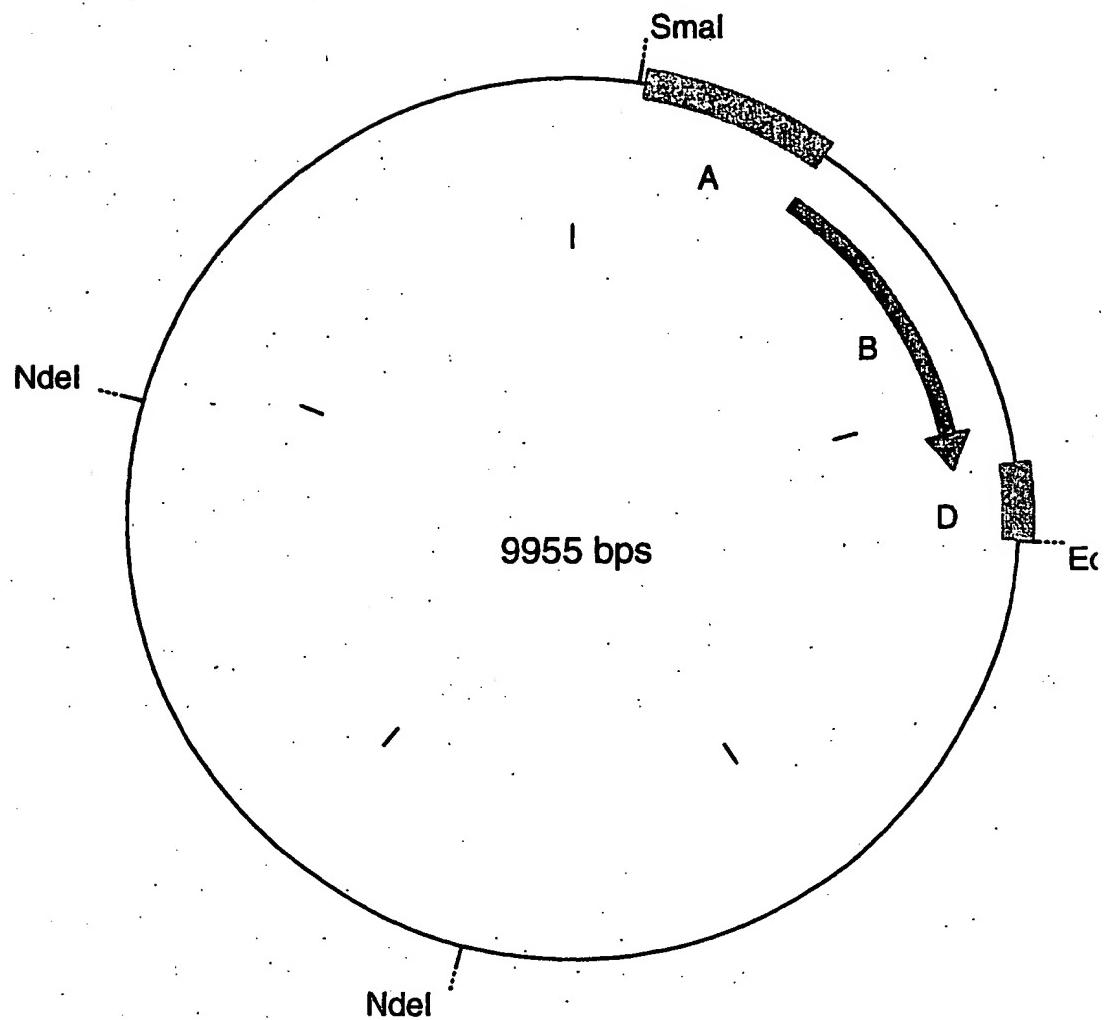
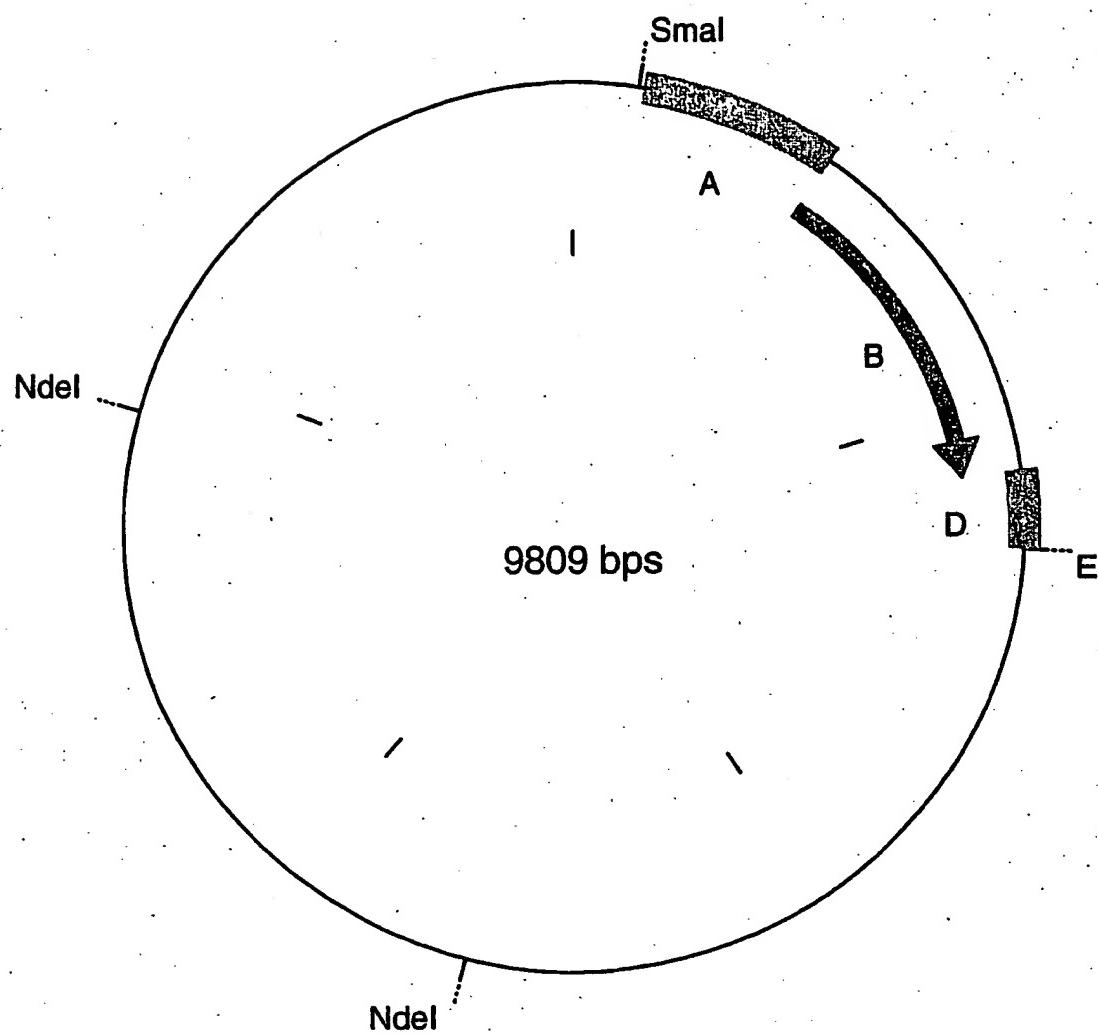


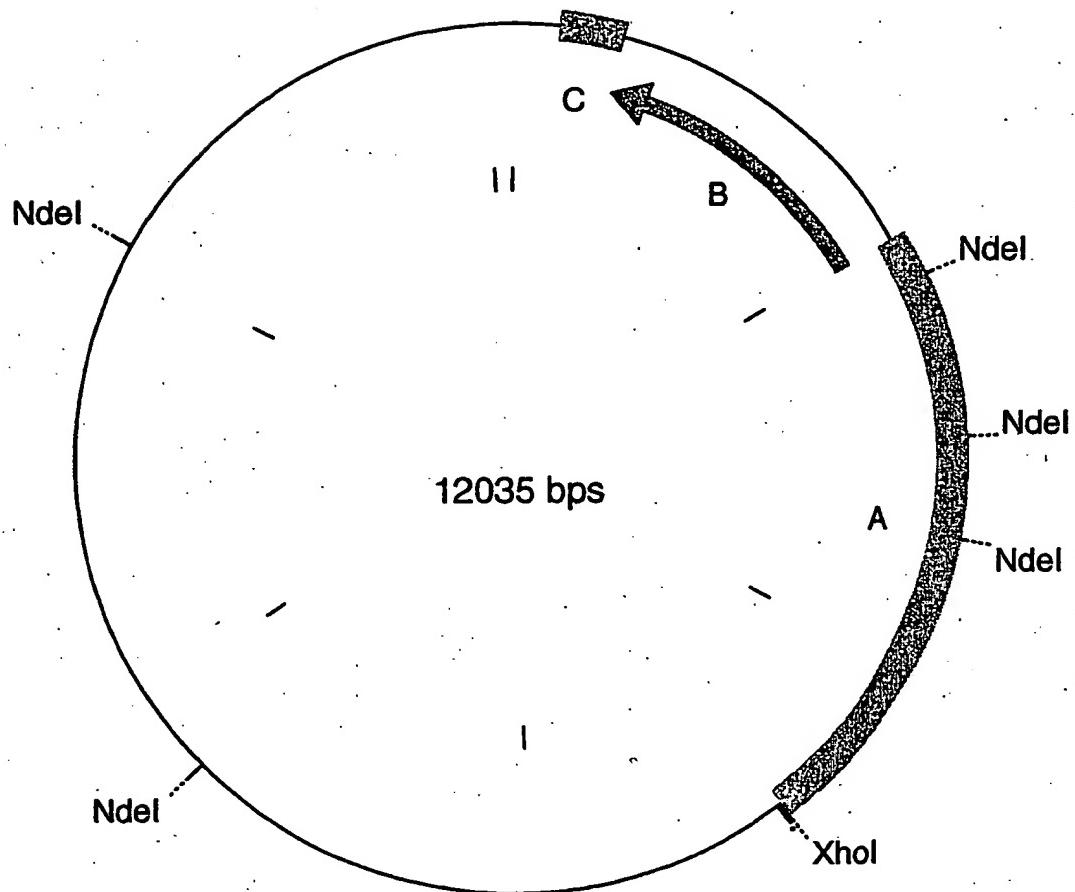
Abbildung 6:

6/63
pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT

7/63

Abbildung 7:

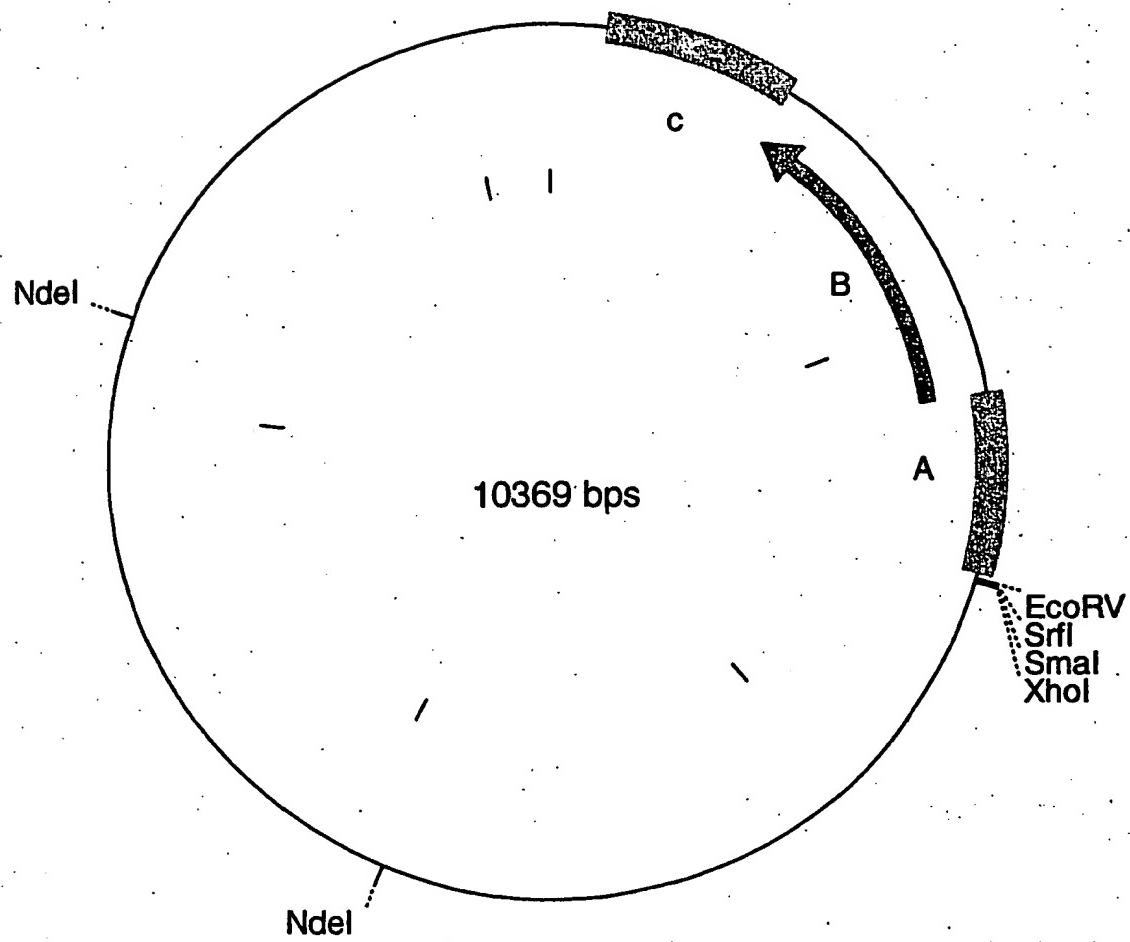
pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT



8/63

Abbildung 8:

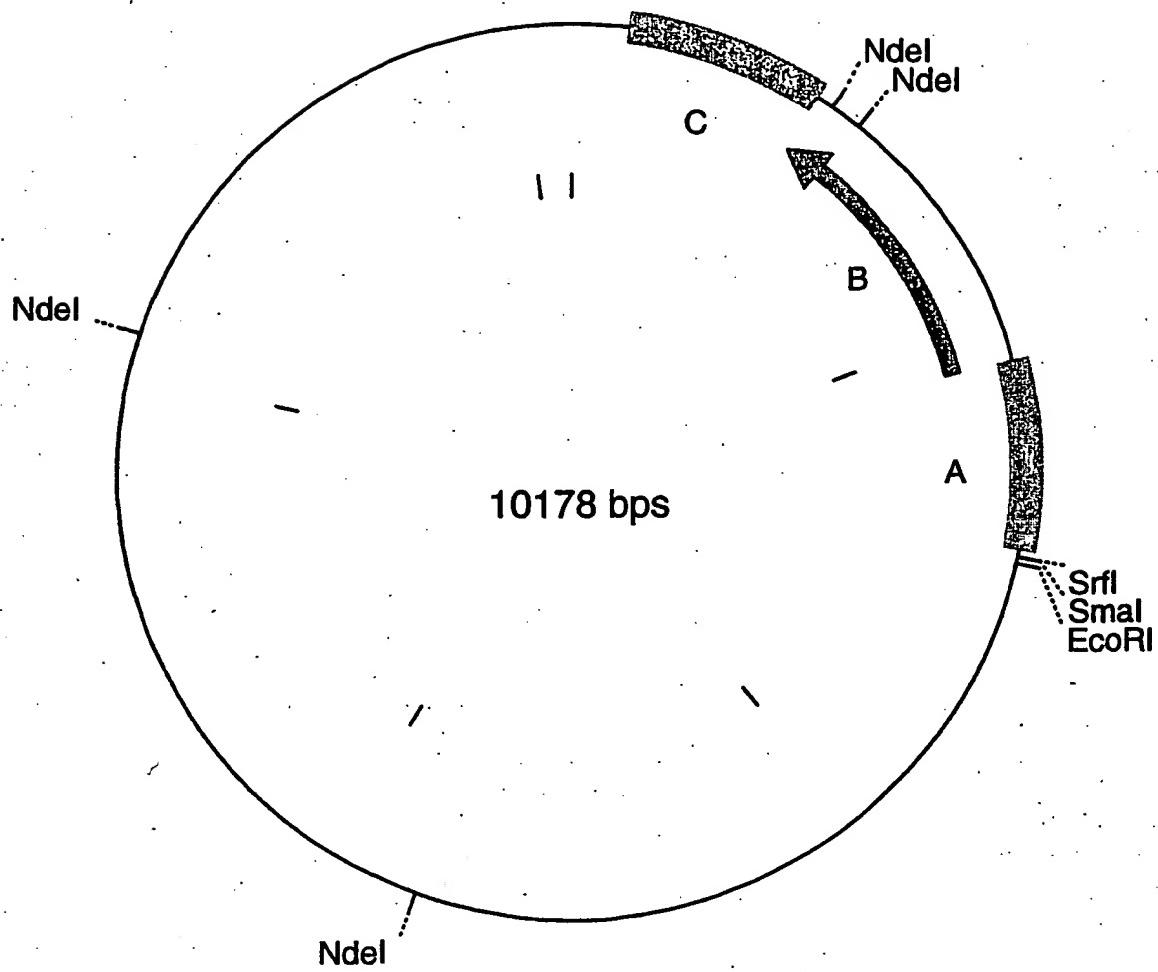
pSUN2-USP-AtHPPD-ocST



9/63

Abbildung 9:

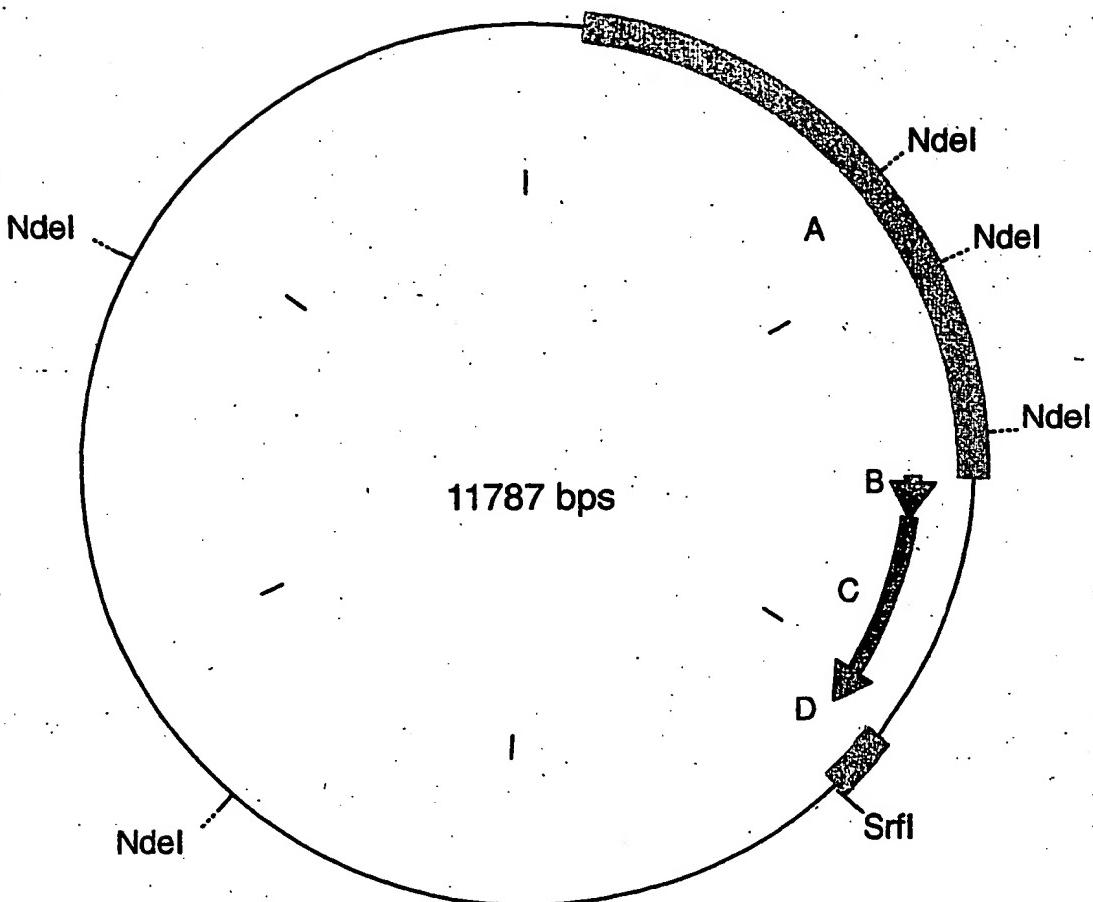
DSUN2-USP-AtHPT-ocST



10/63

Abbildung 10:

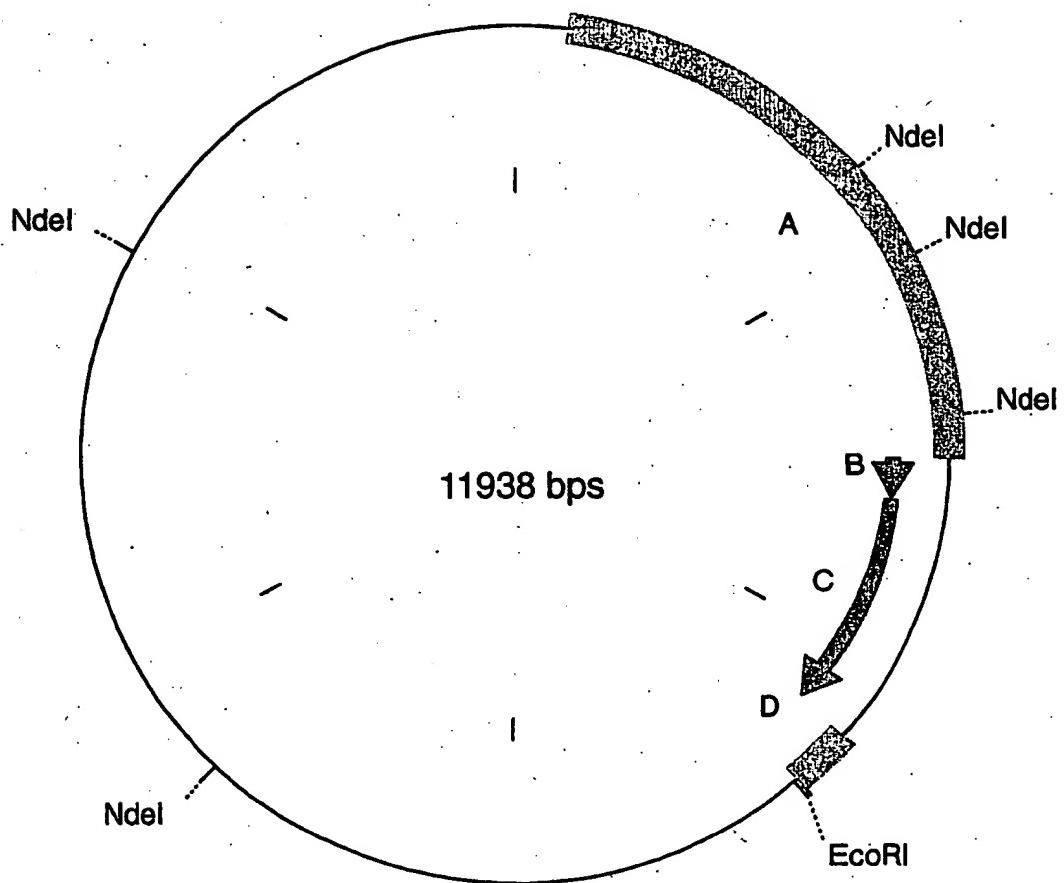
pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT



11/63

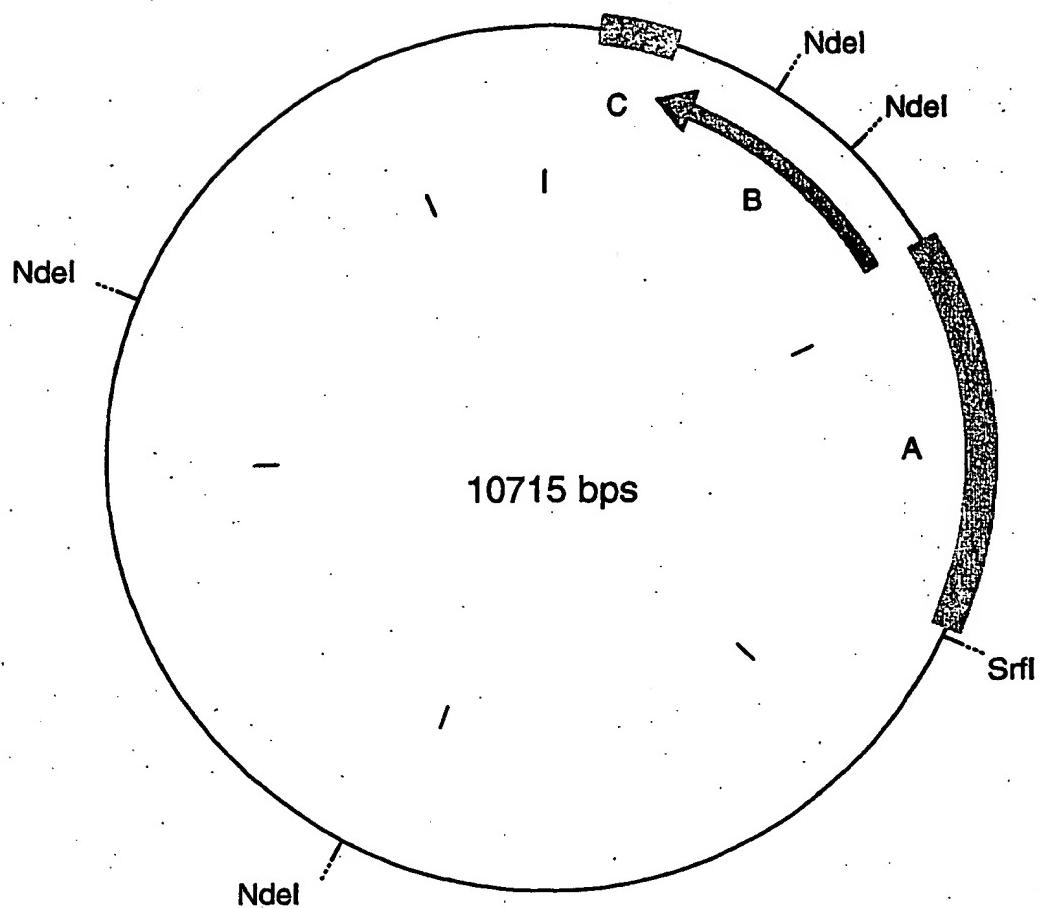
Abbildung 11:

pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT



12/63

Abbildung 12:

pSUN2-SBPP-AtγTMT-35sT

13/63

Abbildung 13:

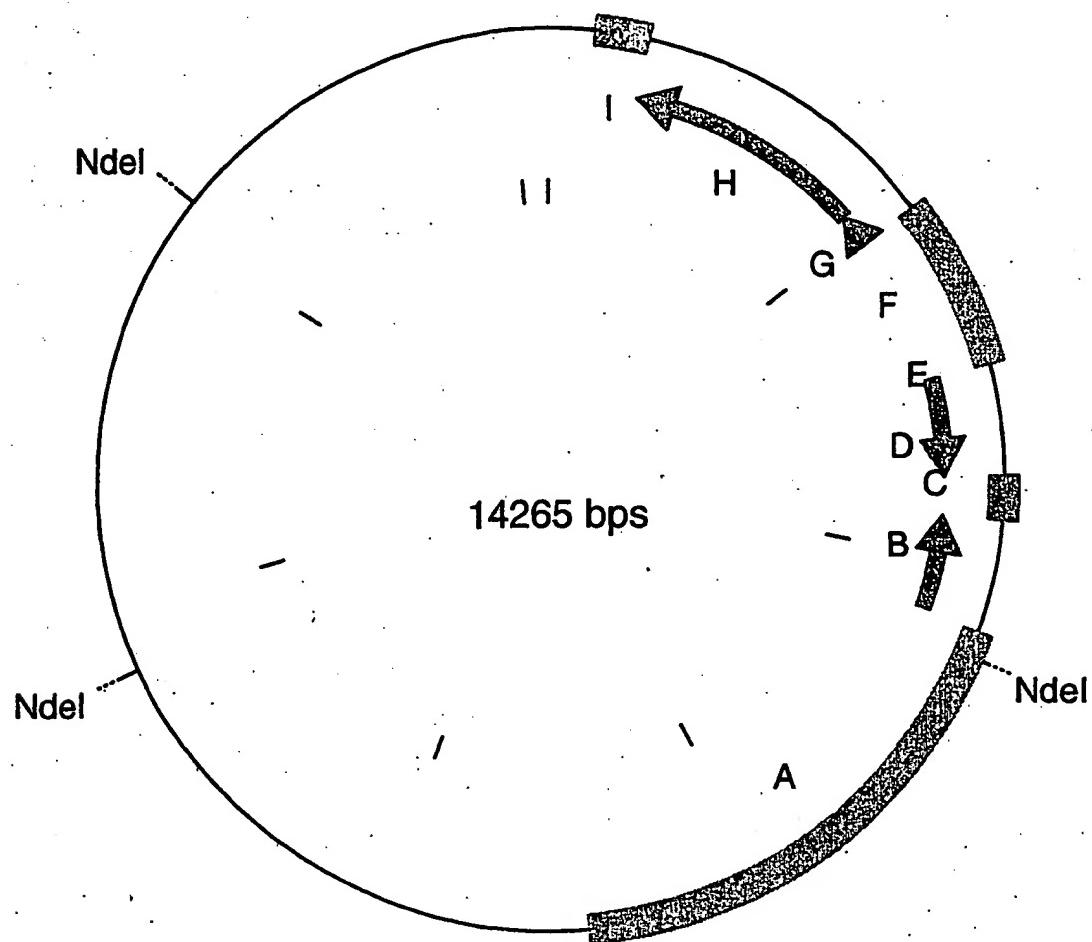
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST-USPP-rbcS-RnTATase-nosT

Abbildung 14:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-AtTAtasel-nosT

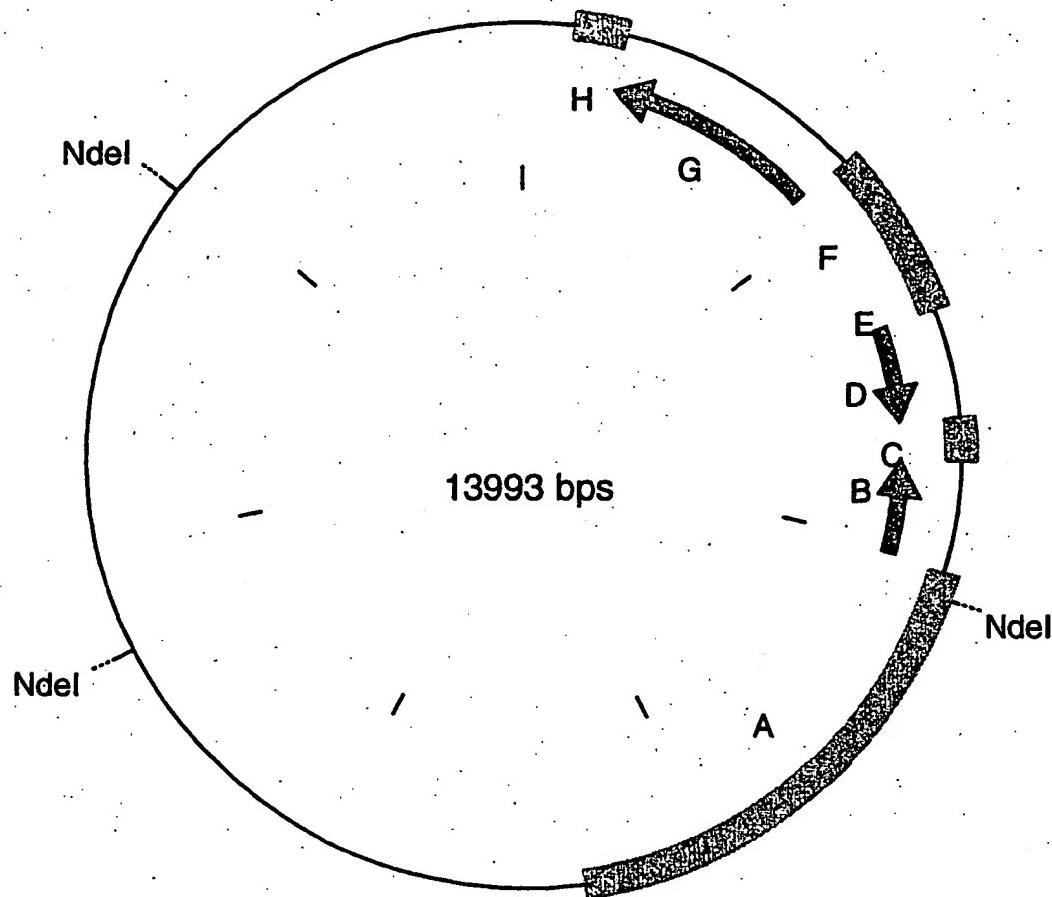
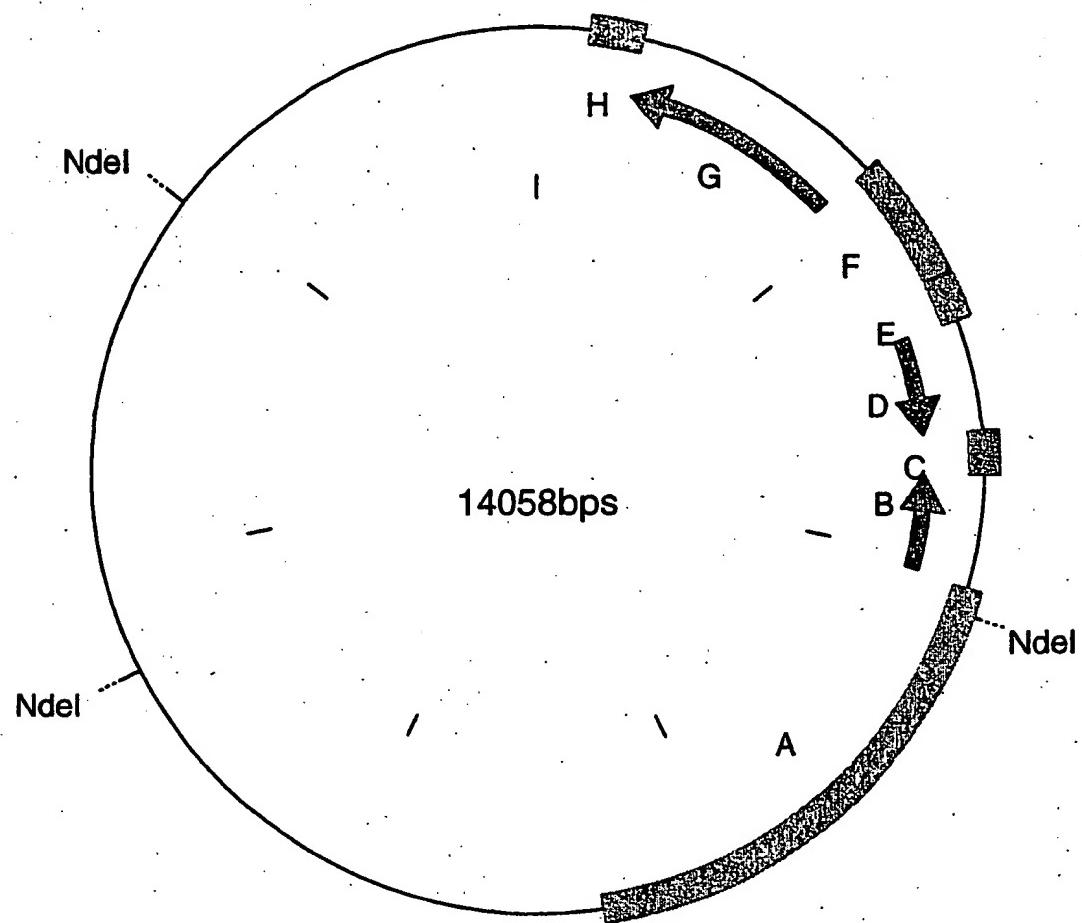
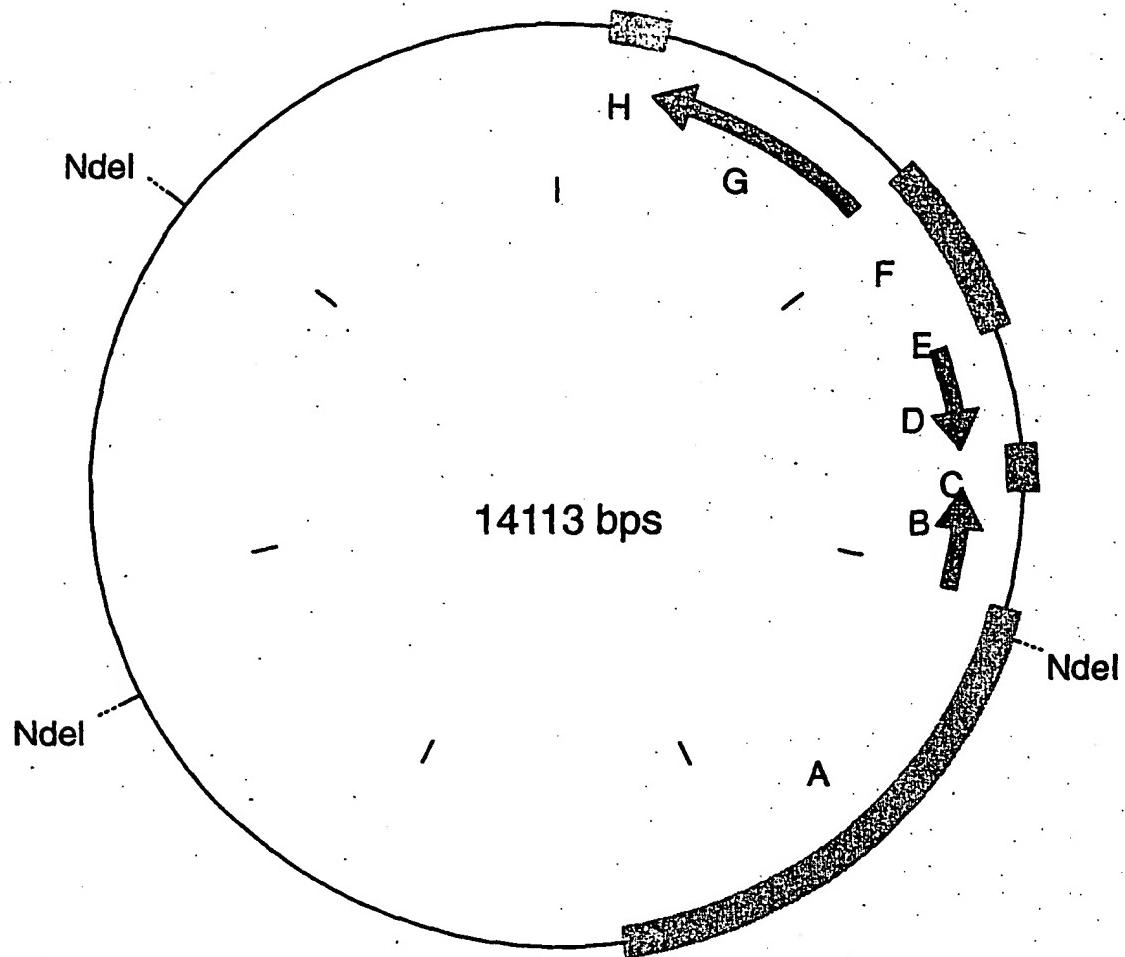


Abbildung 15:

pSUM2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-AtTAtase3-nosT

16/63

Abbildung 16:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST-USPP-AttTase5-nosT

17/63

Abbildung 17:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST-USPP-AtTATase6-nosT

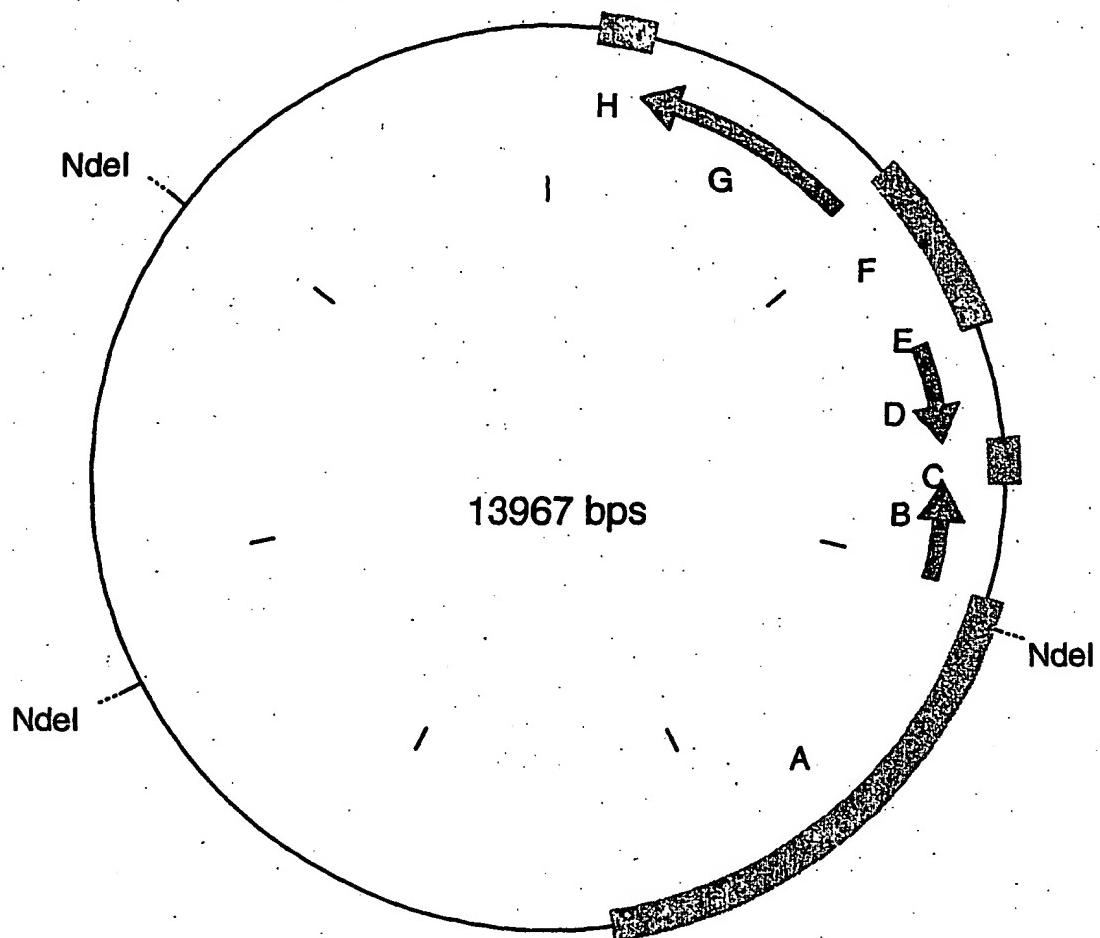
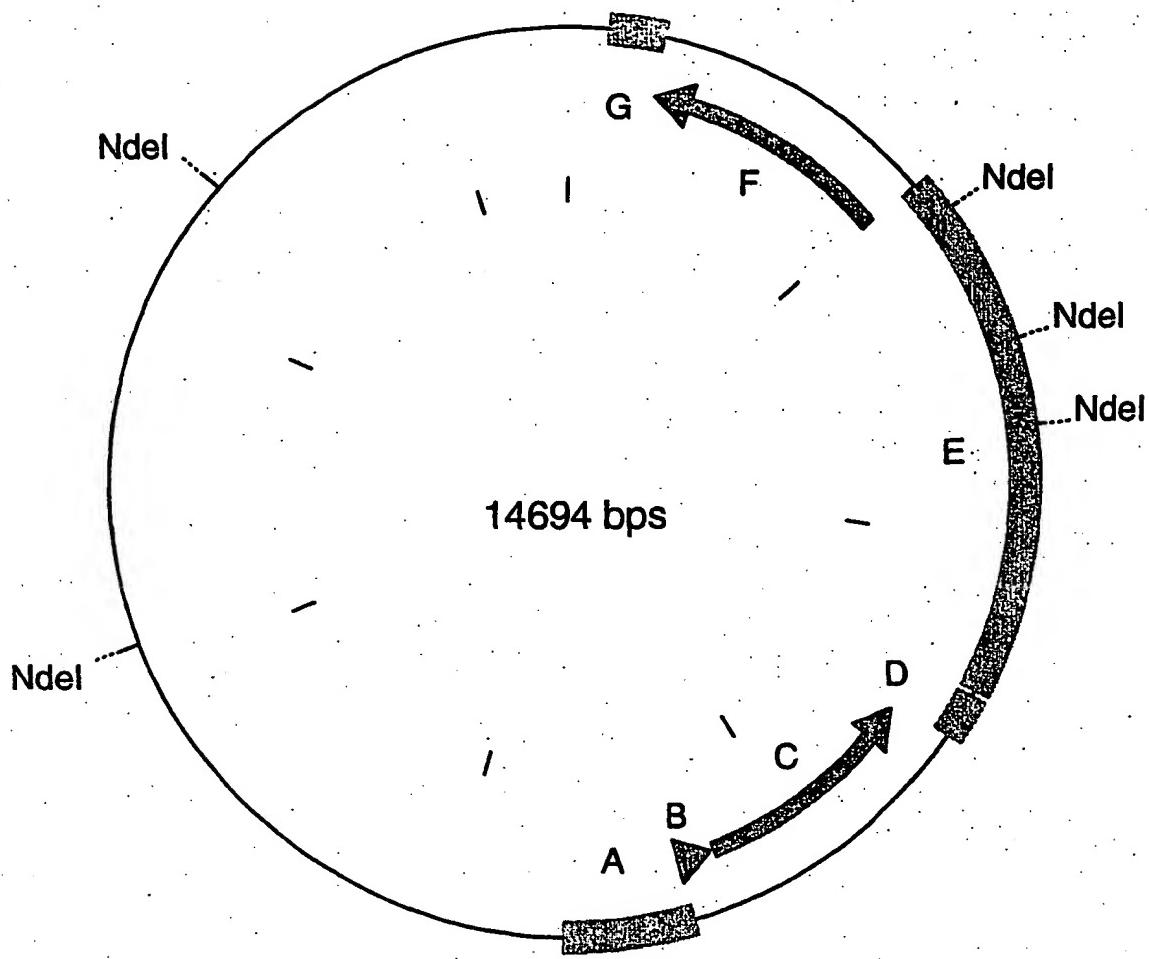
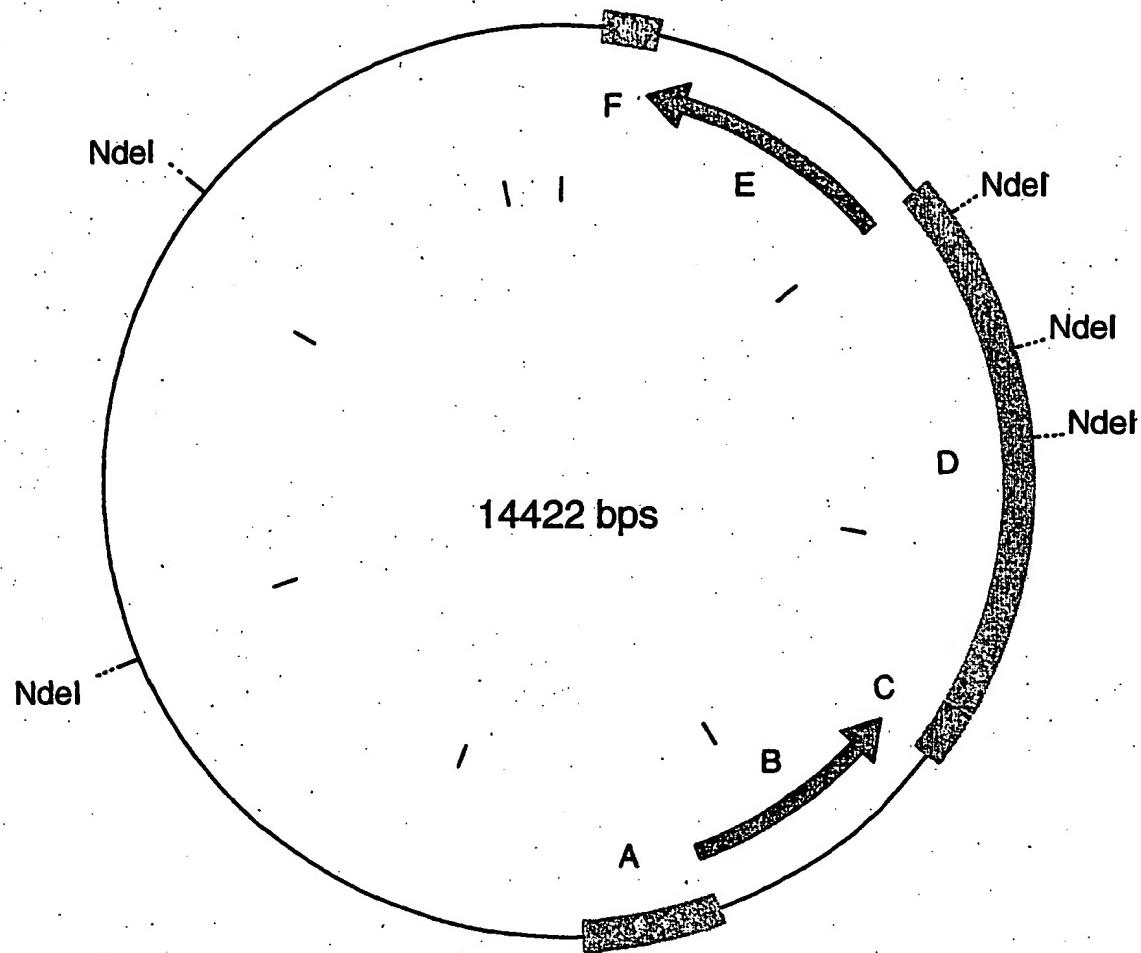


Abbildung 18: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-rbcS-RnTATase-nosT



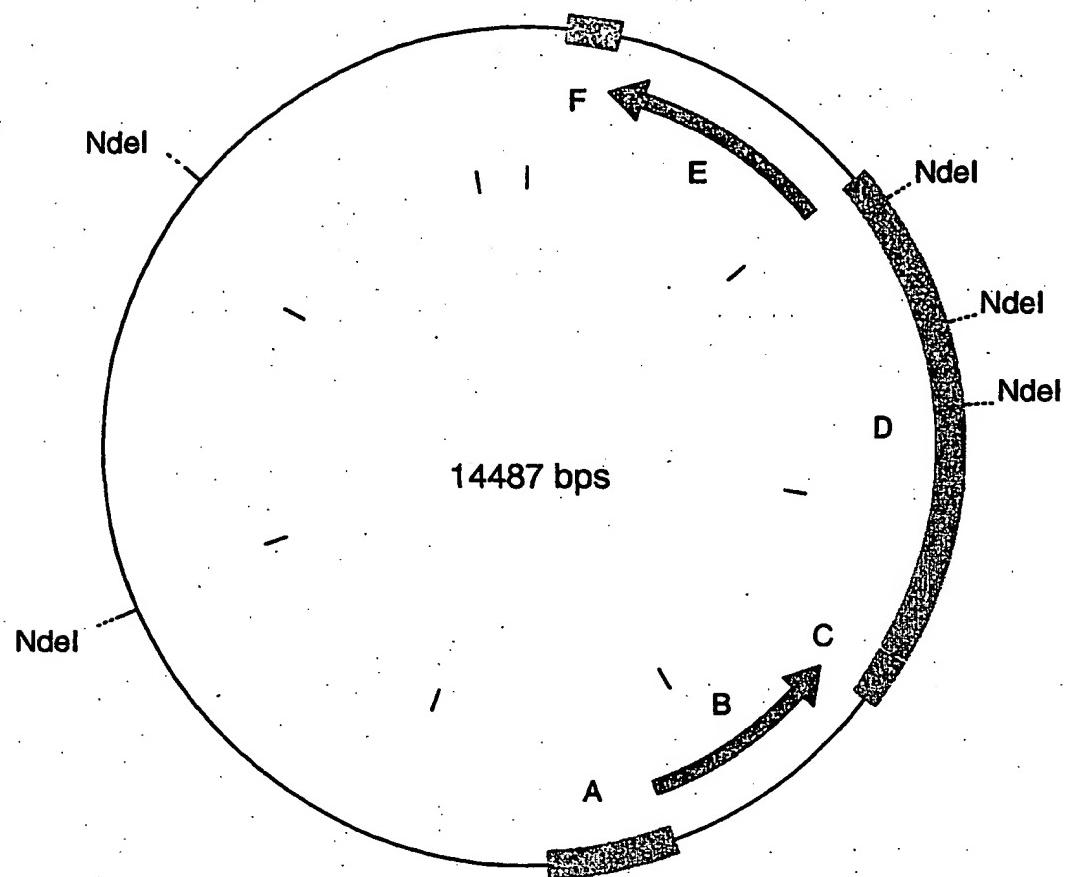
19/63

Abbildung 19: pSUN2-Lab4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AttTAtase1-nosT



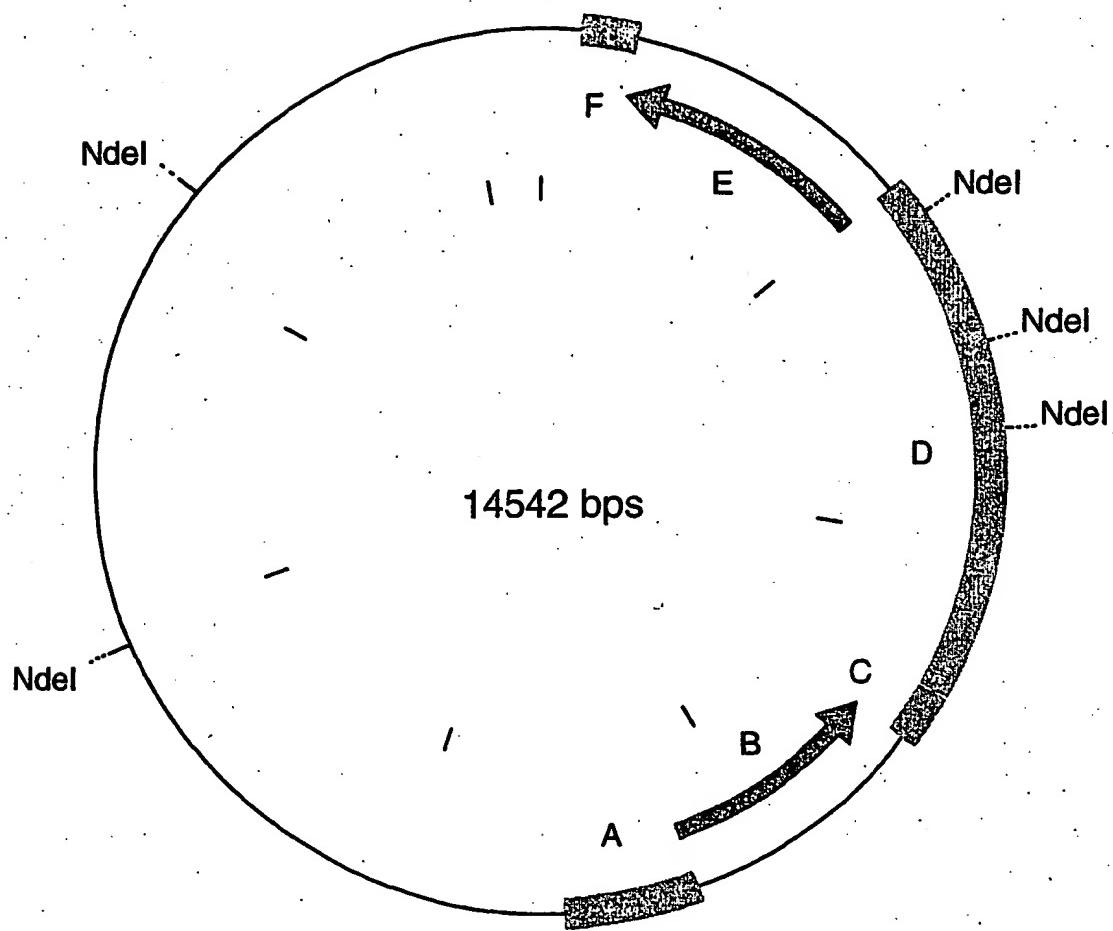
20/63

Abbildung 20: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AttATase3-nosT



21/63

Abbildung 21: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtTATase5-nosT



22/63

Abbildung 22: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AttTase6-nosT

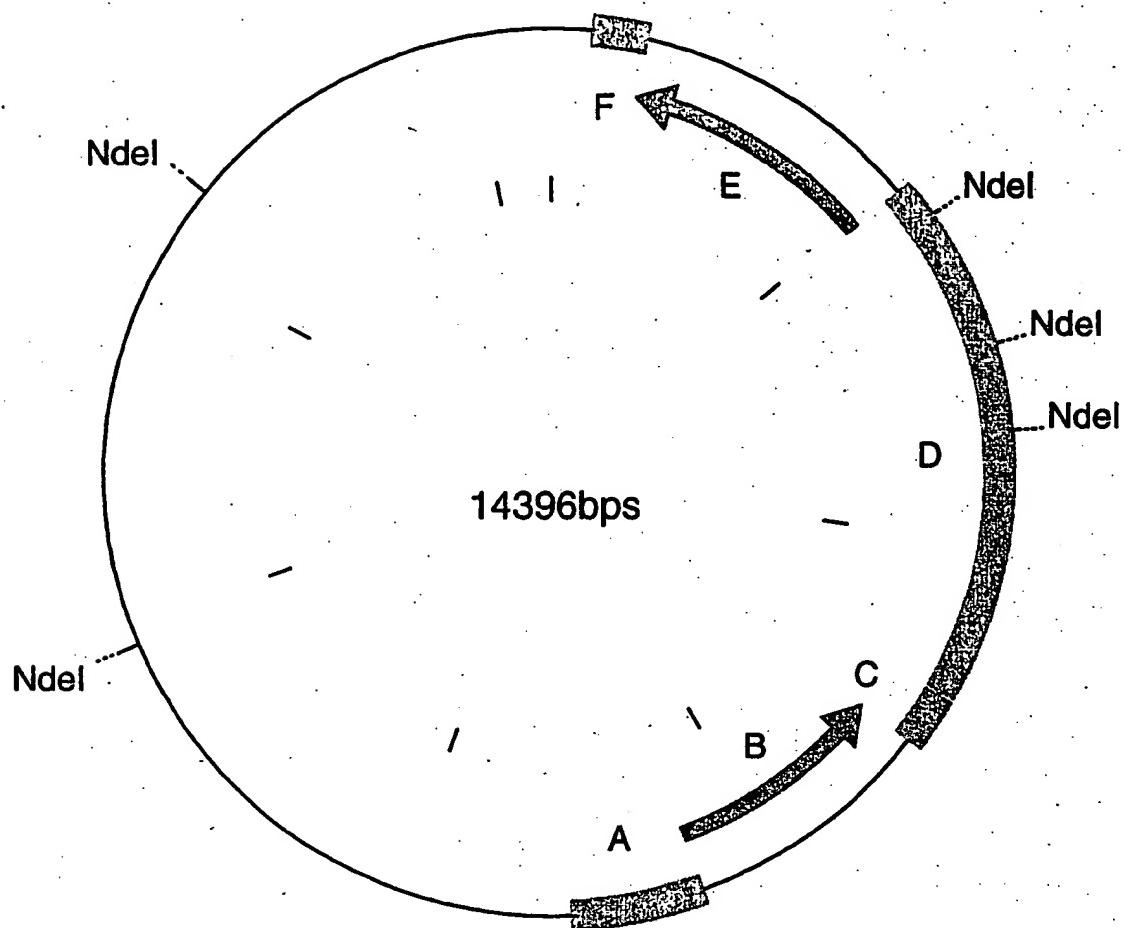


Abbildung 23: pSUN2-USP-AthPPD-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase-nost

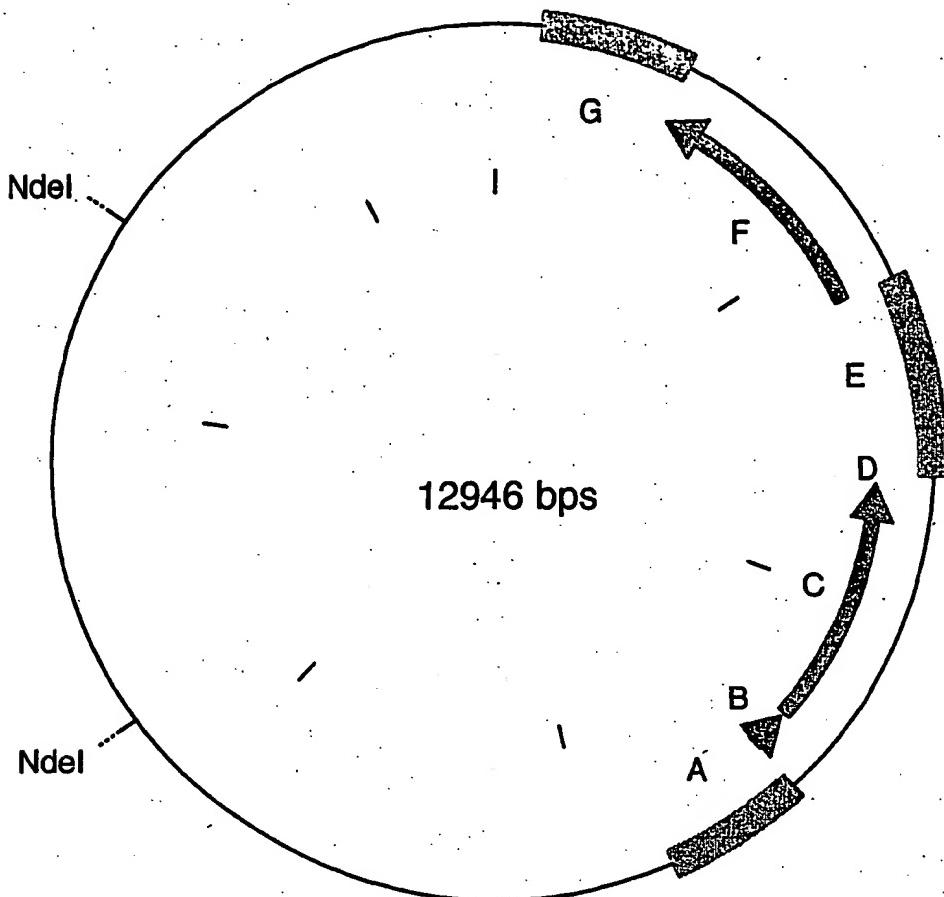
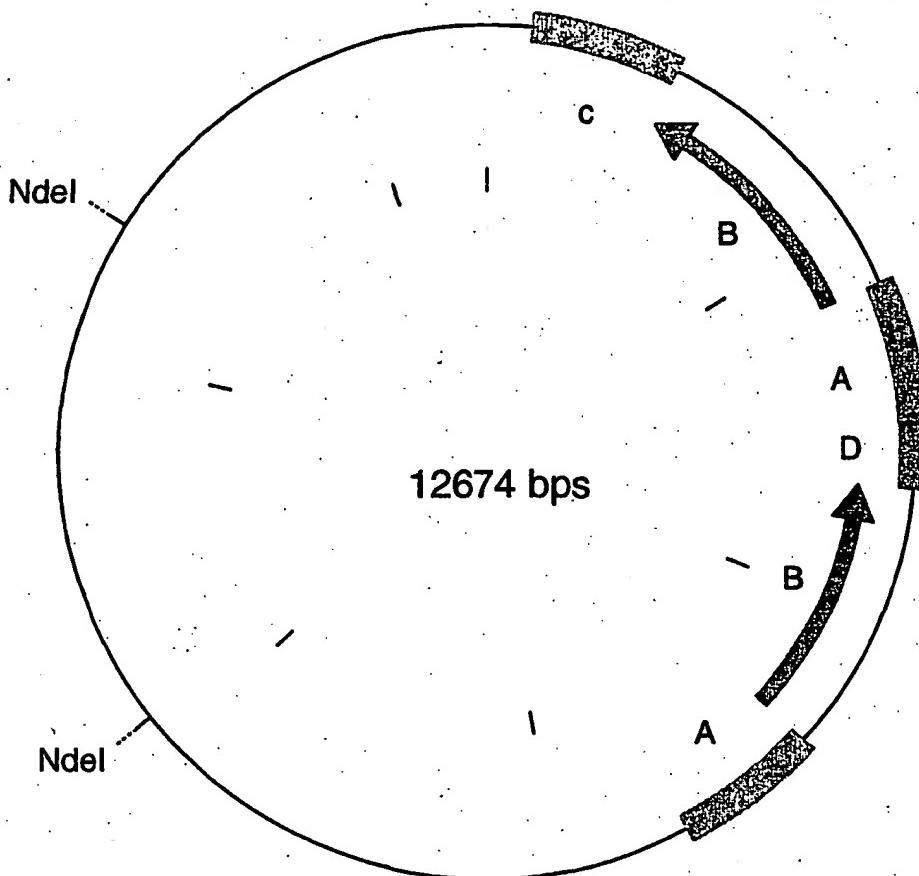
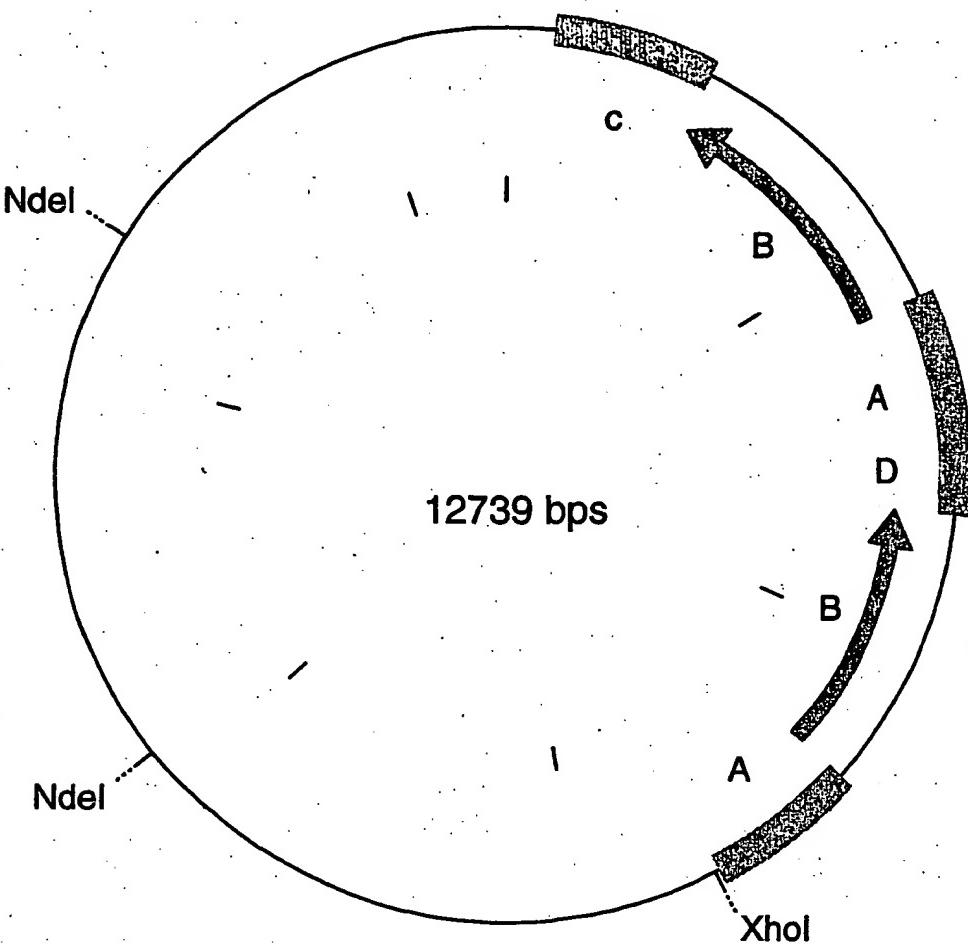


Abbildung 24: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase1-nosT

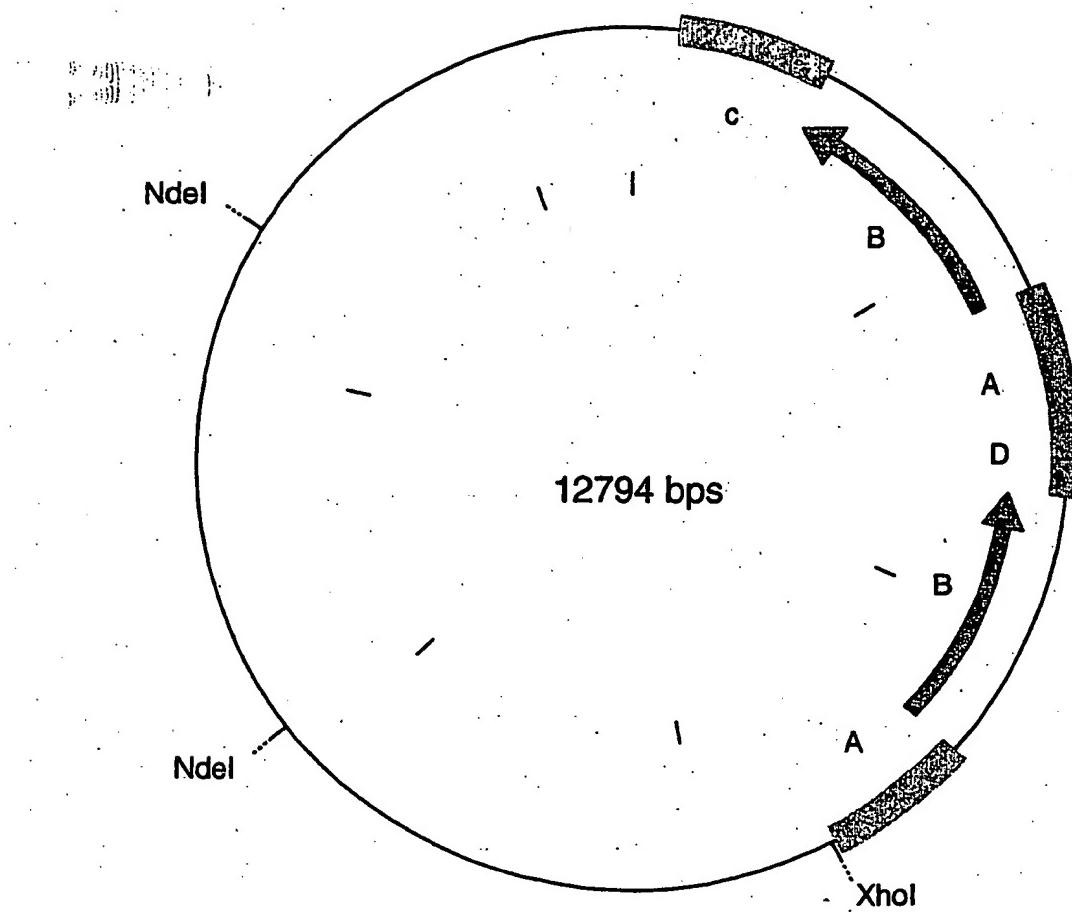


25/63

Abbildung 25: pSUN2-USP-AtHPPD-ocST-USPP-AtTATase3-nosT

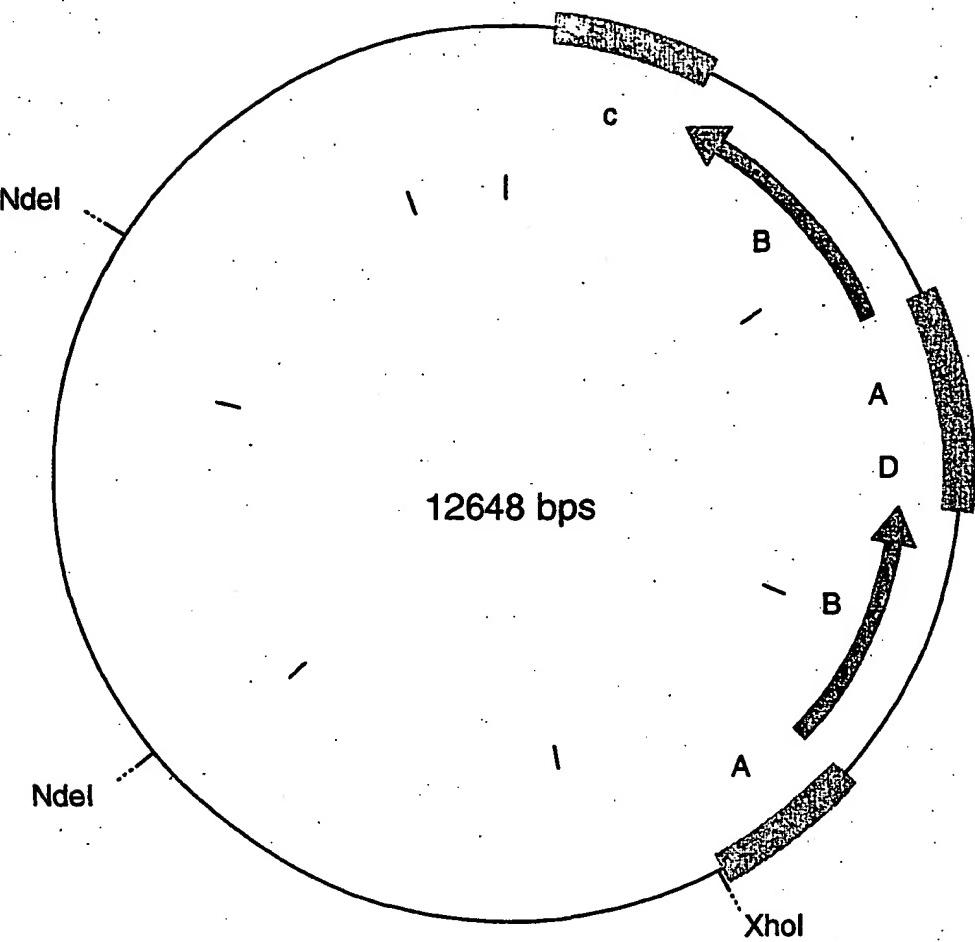


26/63

Abbildung 26: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase5-nosT

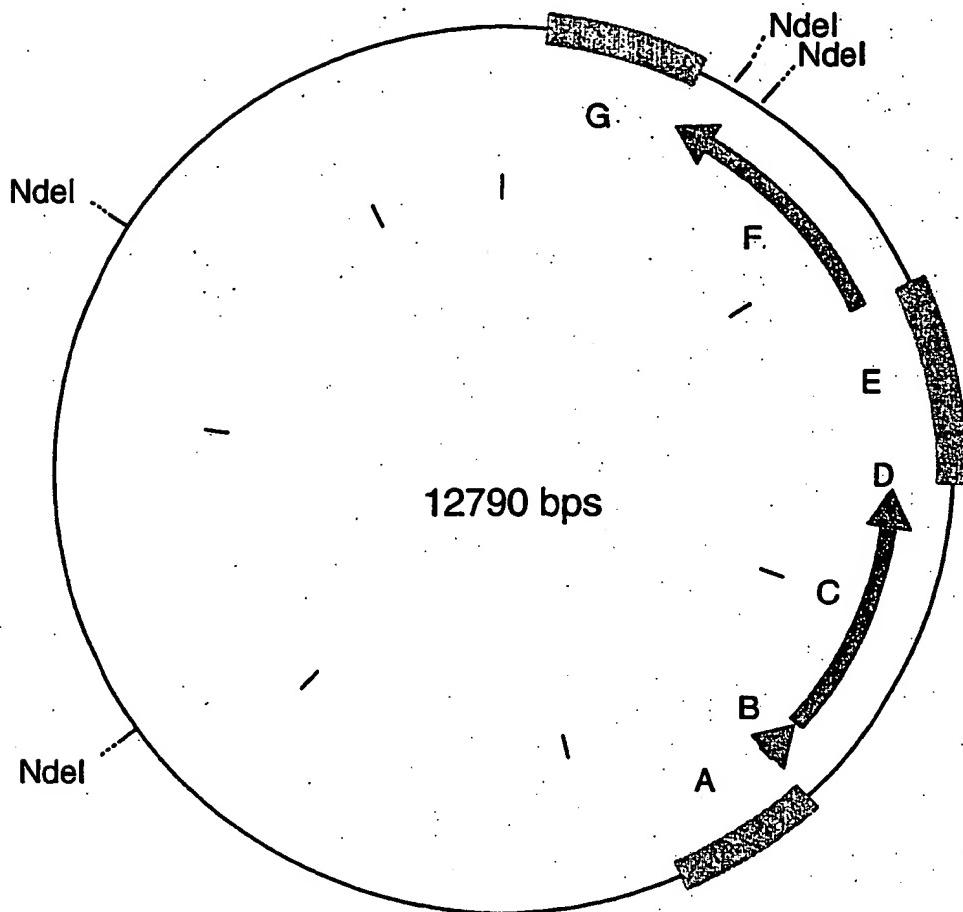
27/63

Abbildung 27: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase6-nosT



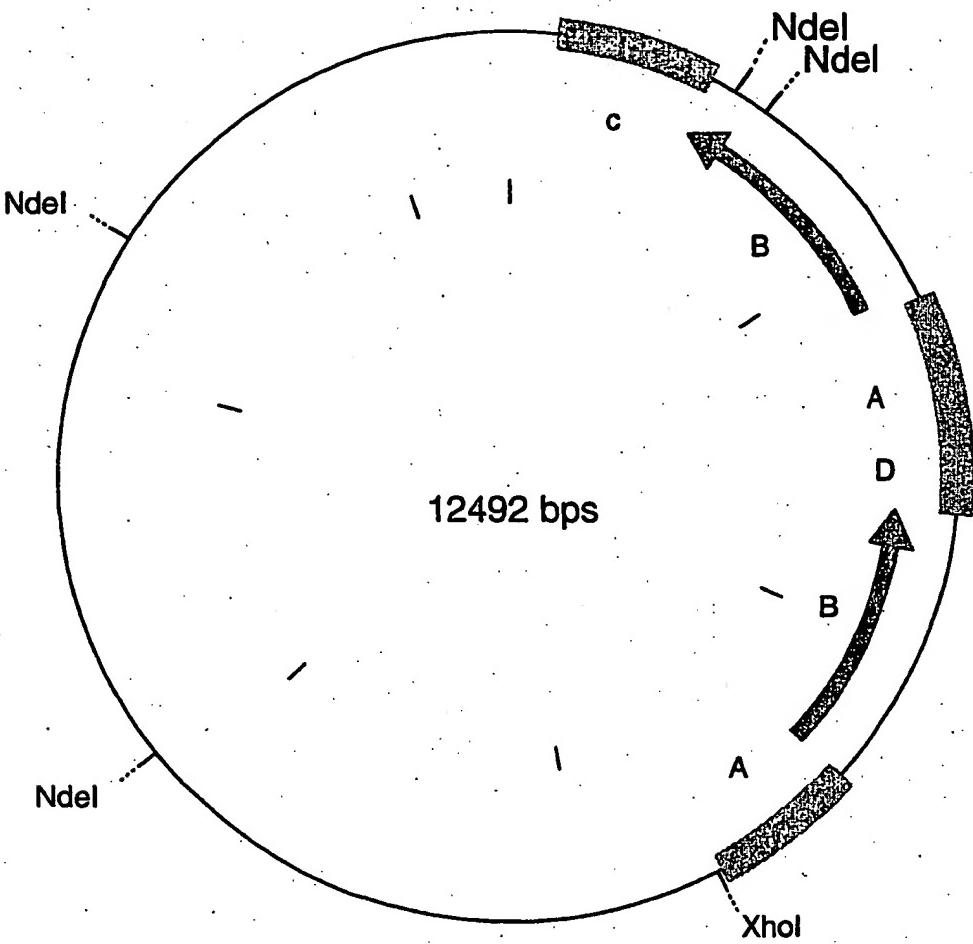
28/63

Abbildung 28: pSUN2-USP-AtHPT-ocst-USPP-rbcS-RnTATase6-nost



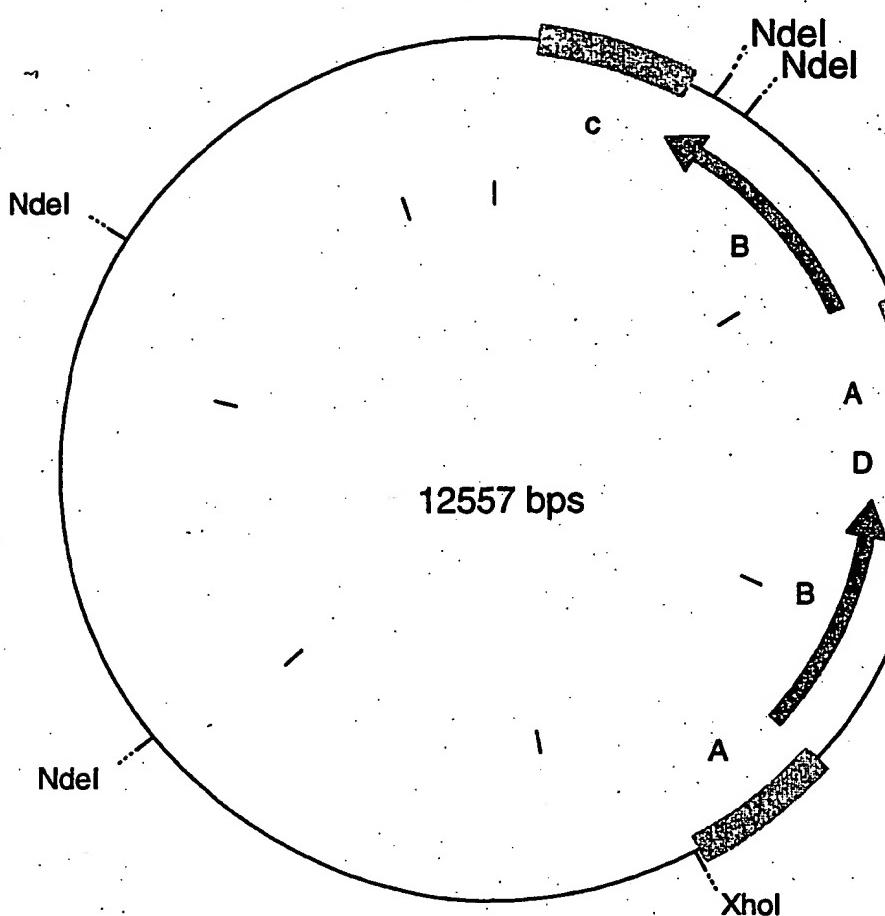
29/63

Abbildung 29: pSUN2-USP-AtHPT-ocST-USPP-AtTATase1-nost



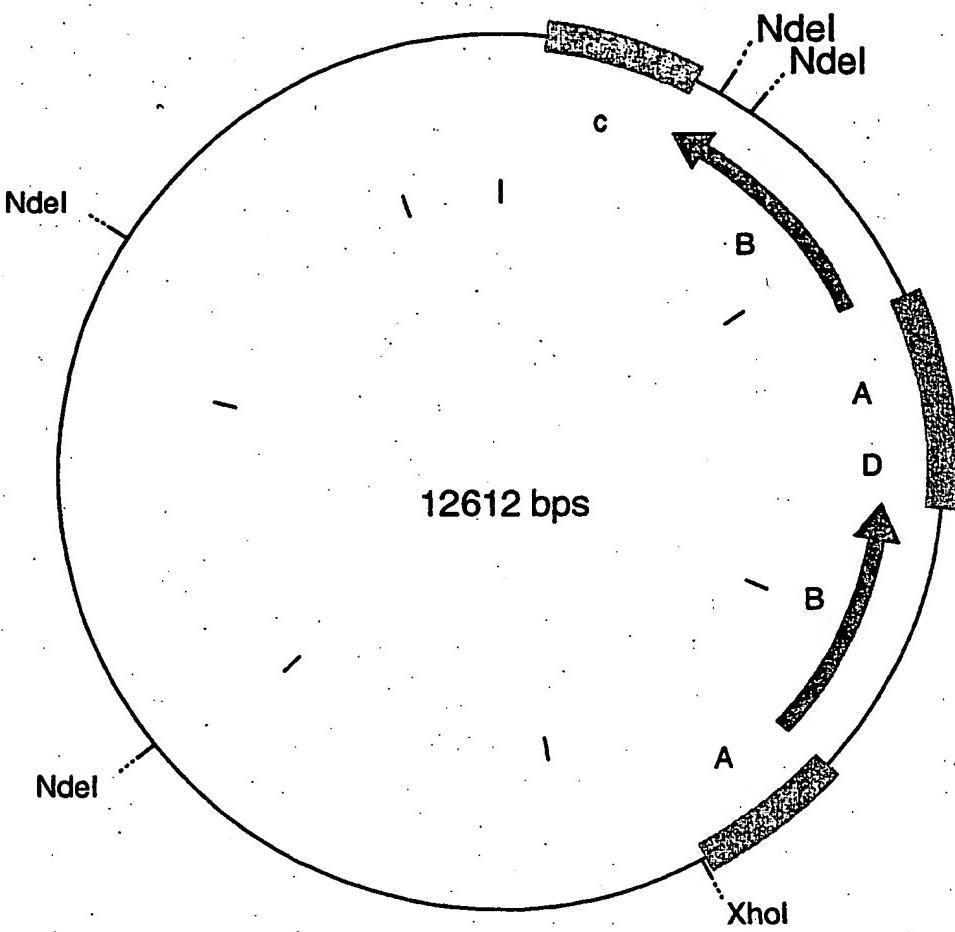
30/63

Abbildung 30: pSUN2-USP-AtHPT-ocST-USPP-AtTATase3-nost



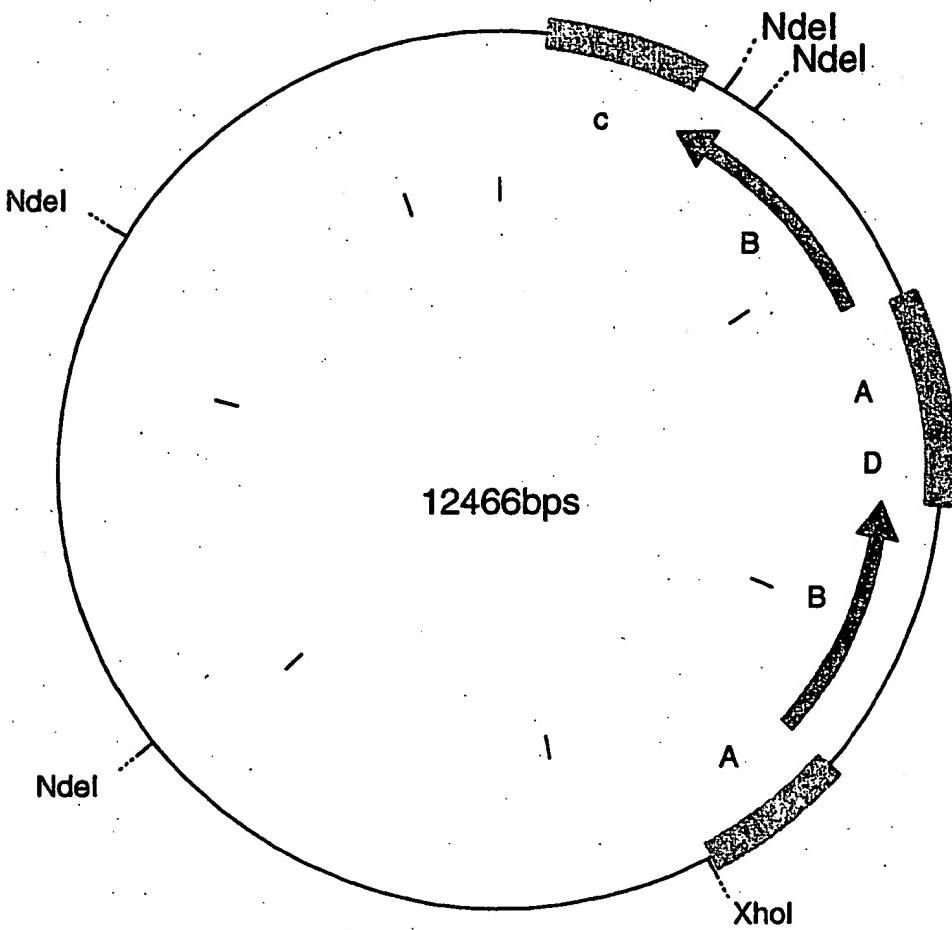
31/63

Abbildung 31: pSUN2-USP-AtHPT-ocST-USPP-AtTAtase5-nost



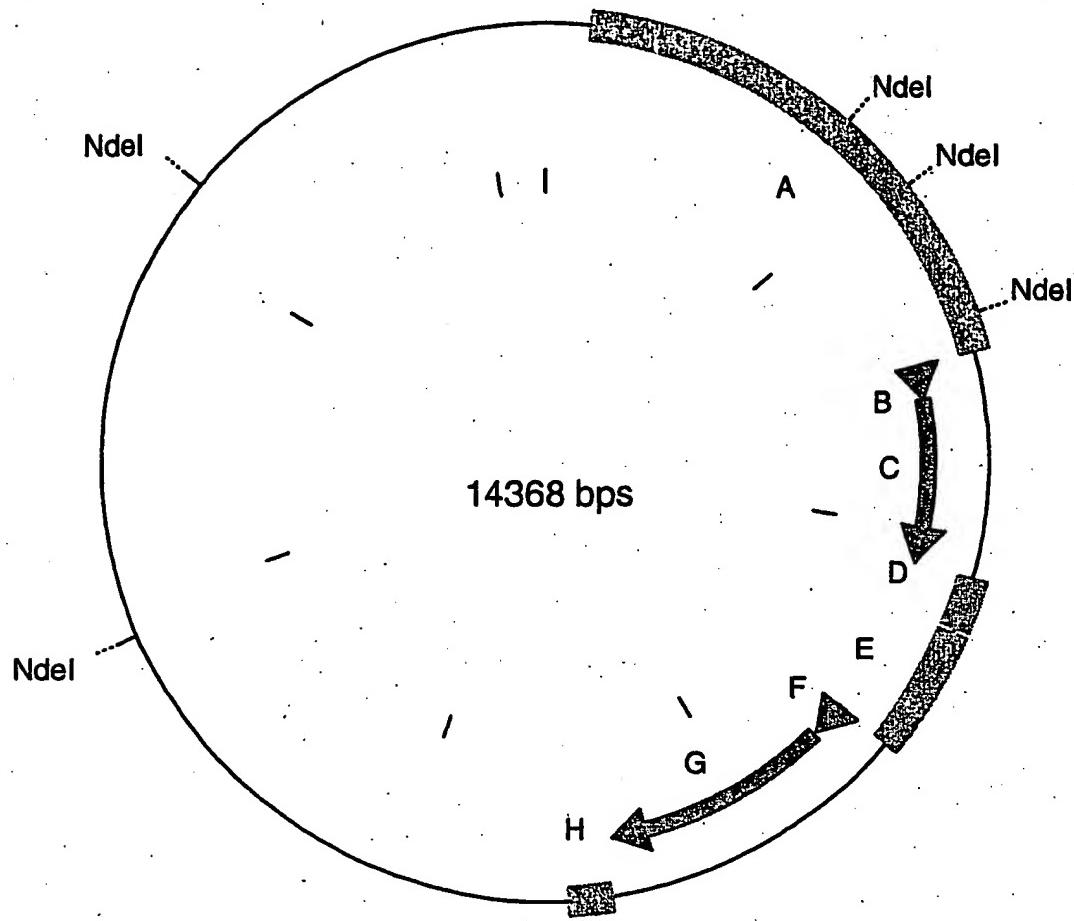
32/63

Abbildung 32: pSUN2-USP-AtHPT-ocST-USPP-AtTATAse6-nost



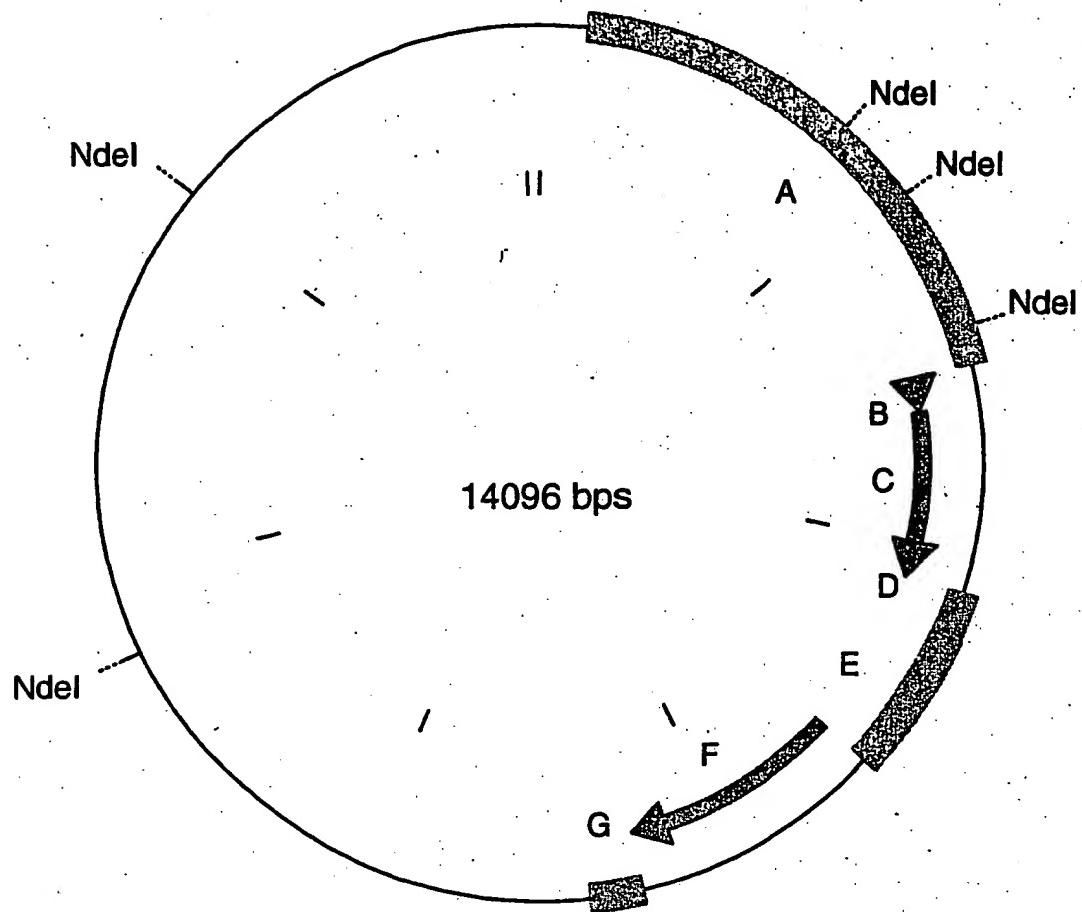
33/63

Abbildung 33: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-rbcS-RnTATase-nosT



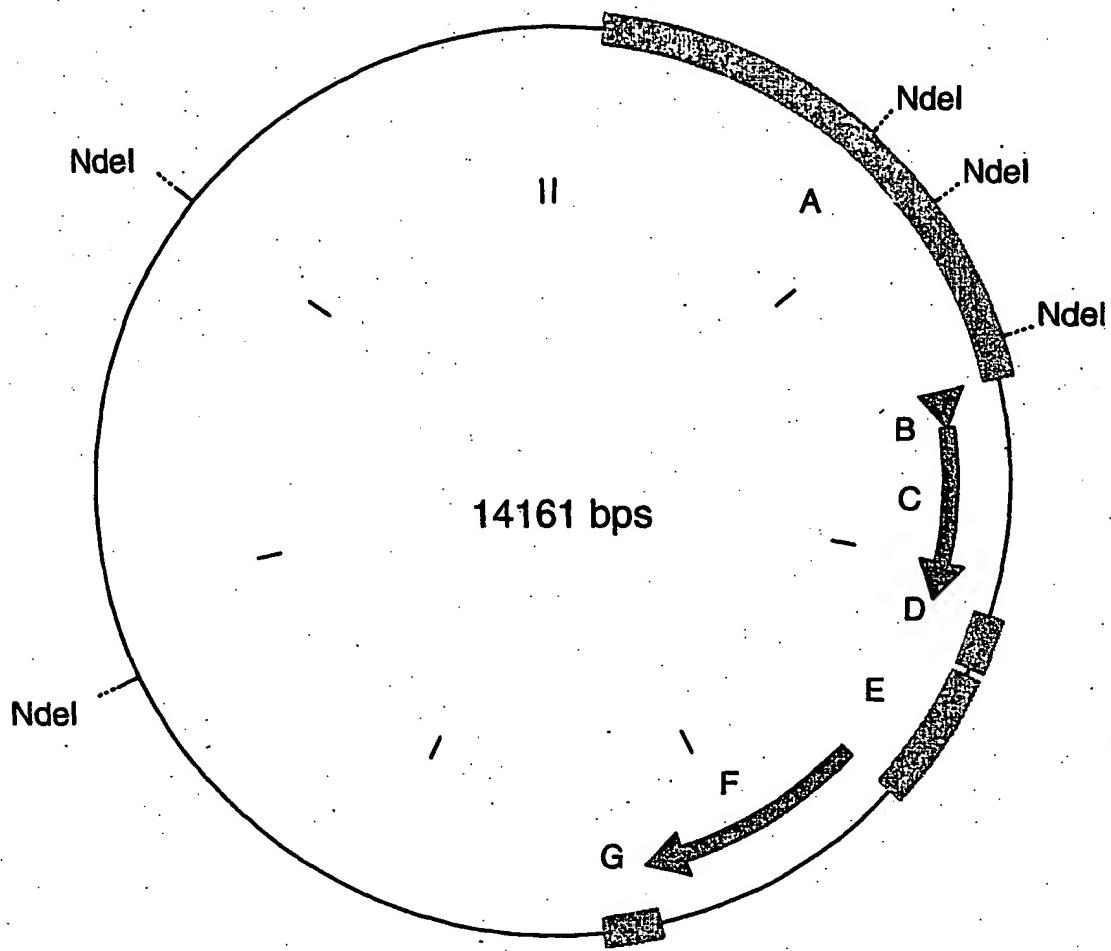
34/63

Abbildung 34: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-AtTAtase1-nosT



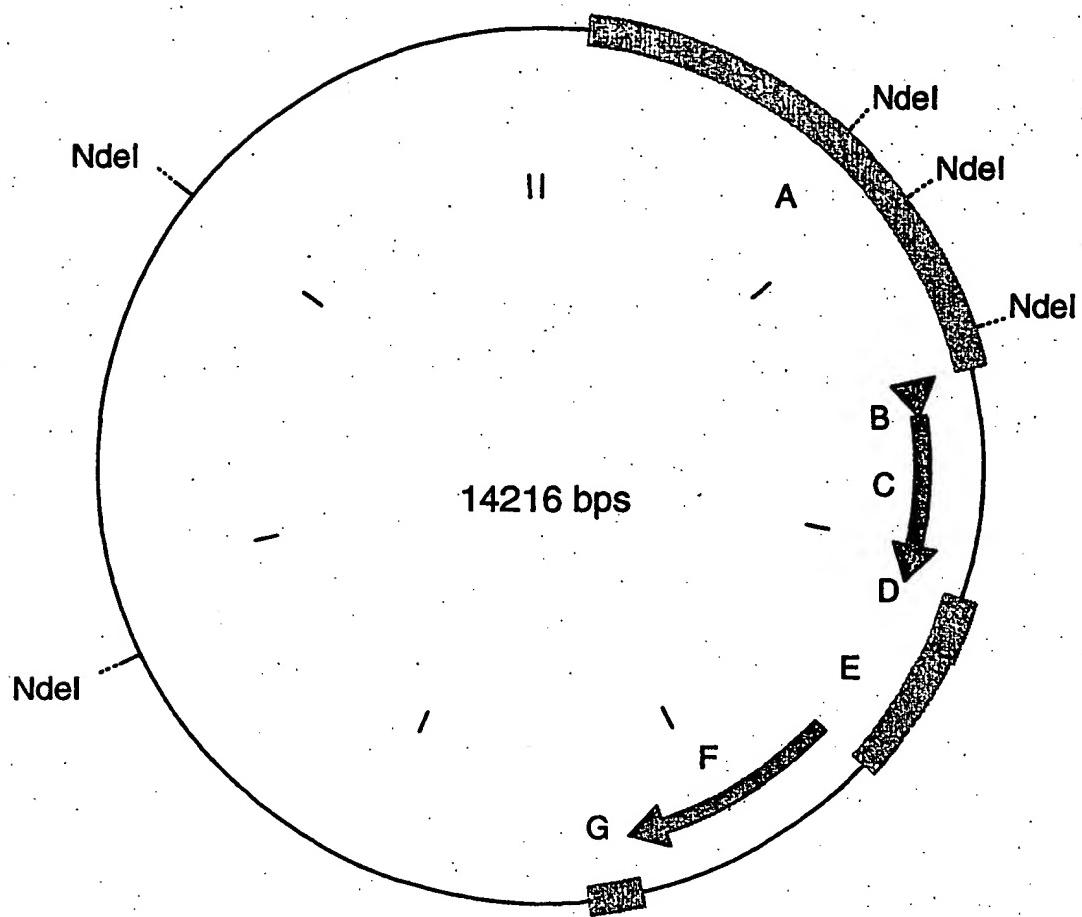
35/63

Abbildung 35: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AttTATAse3-nost



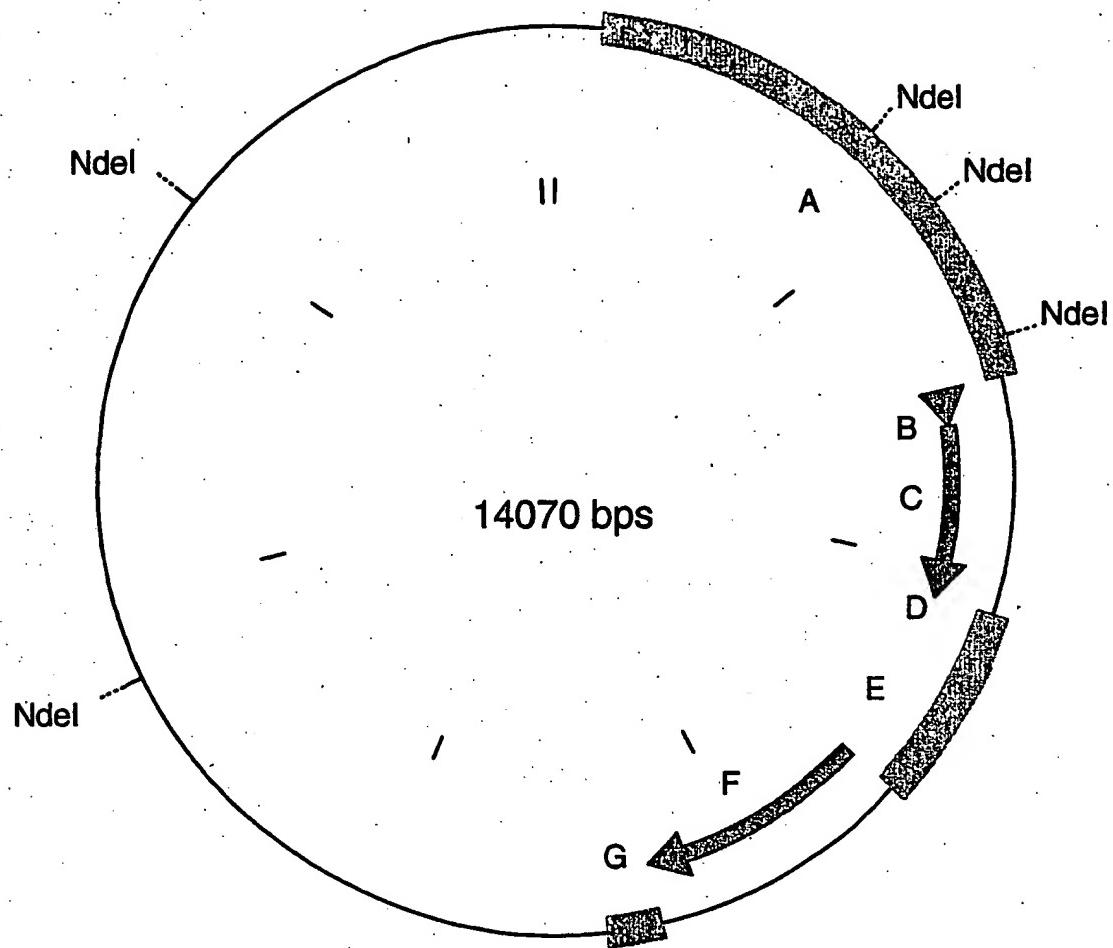
36/63

Abbildung 36: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase5-nost



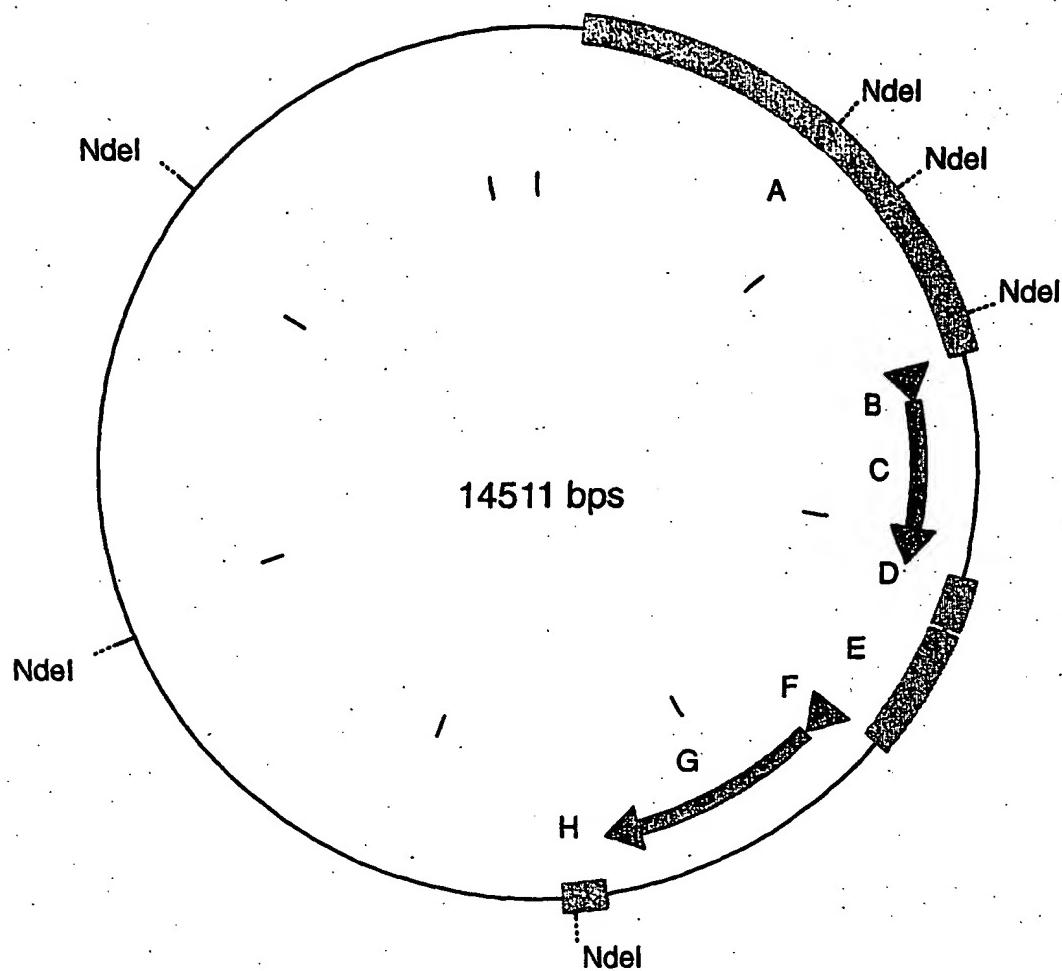
37/63

Abbildung 37: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-AtTATAse6-nosT



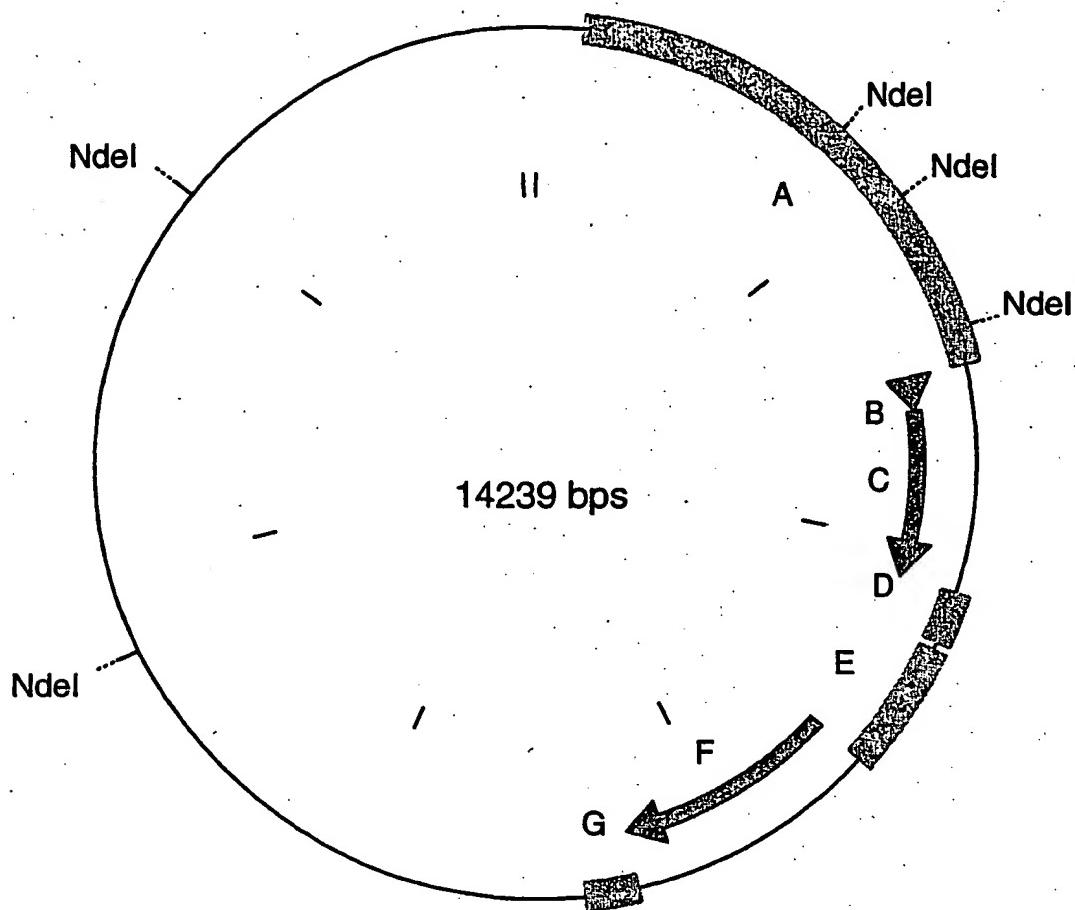
38/63

Abbildung 38: pSUM2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-rbcS-RnTA-Tase-nosT



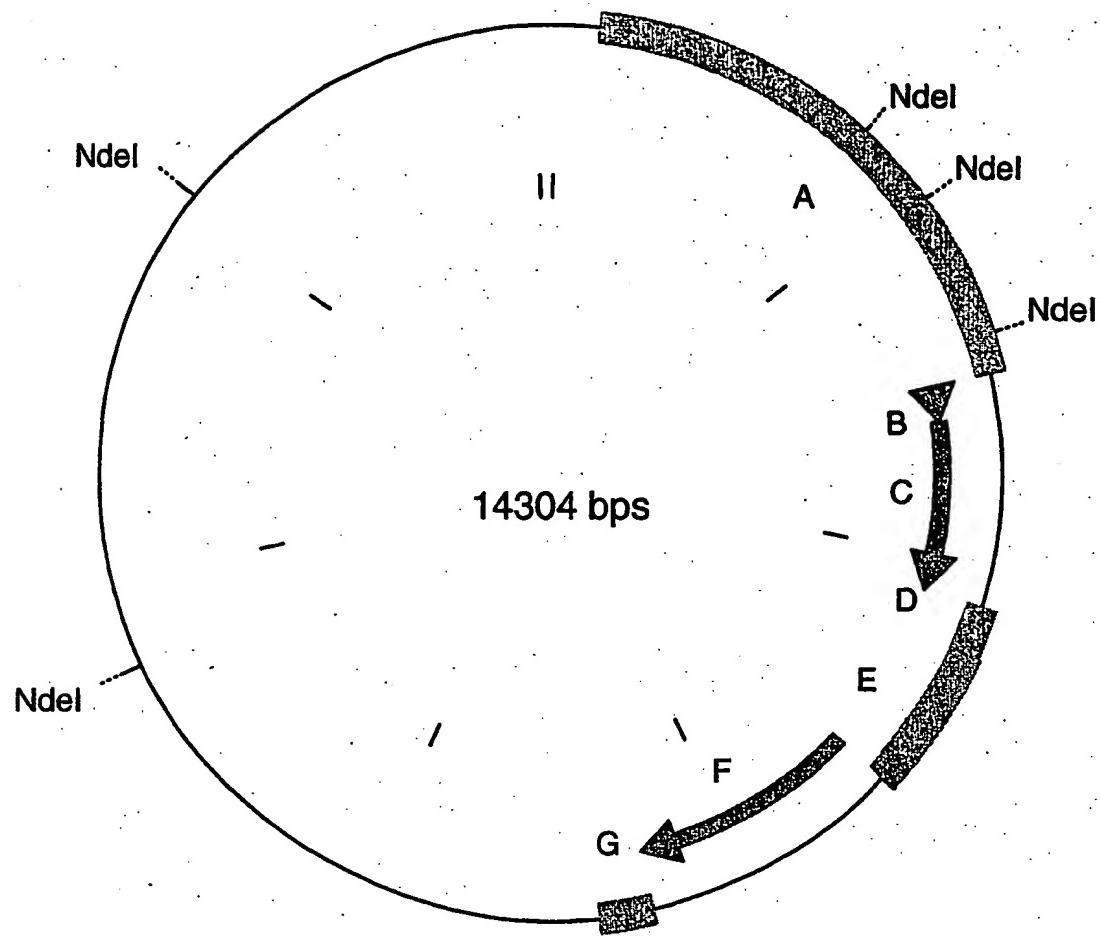
39/63

Abbildung 39: pSUN2-Leb4-IPPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTAtase1-nosT



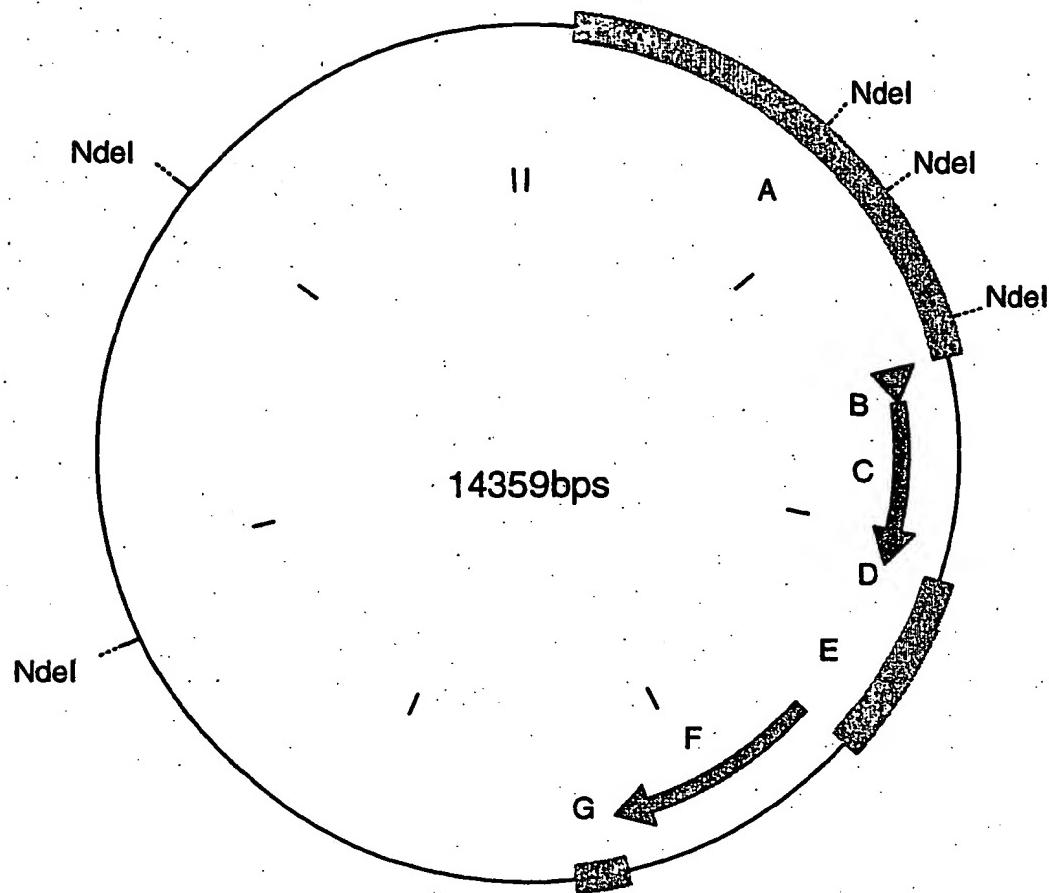
40/63

Abbildung 40: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase3-nosT



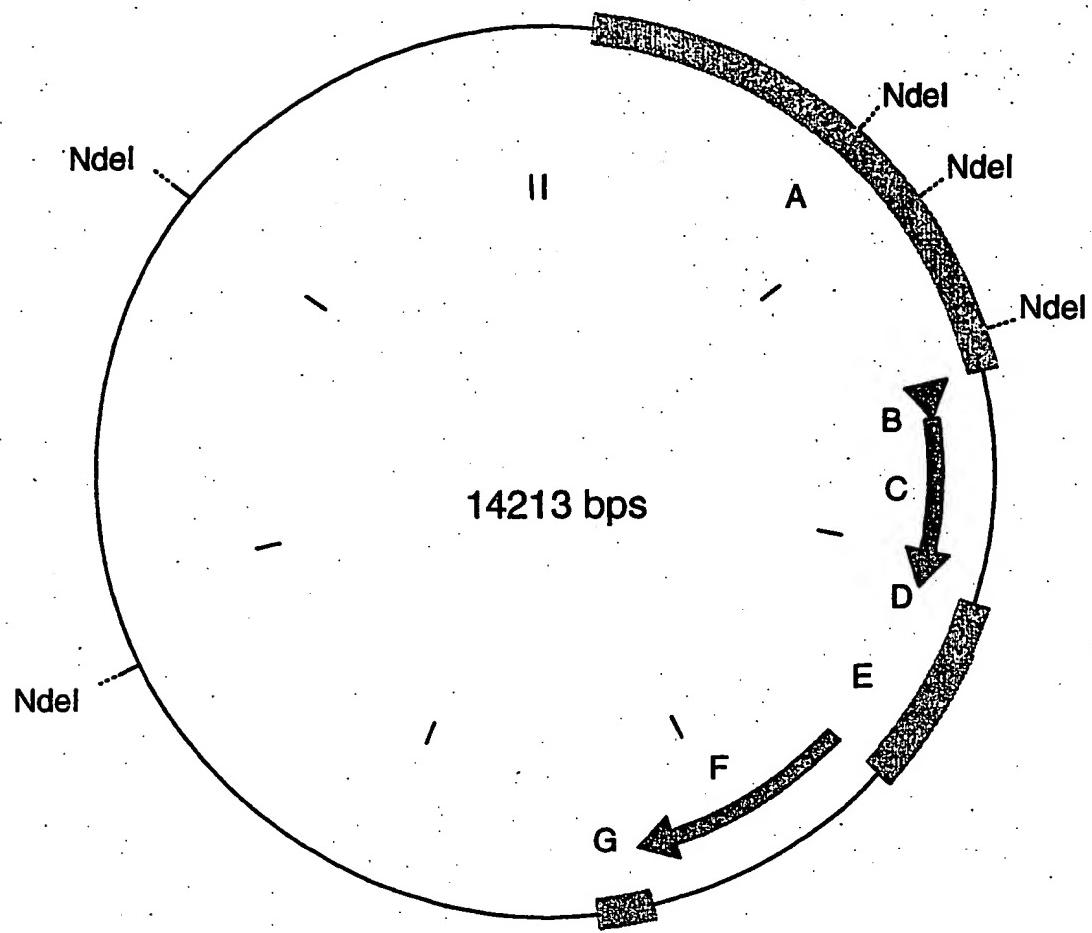
41/63

Abbildung 41: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATAse5-nosT

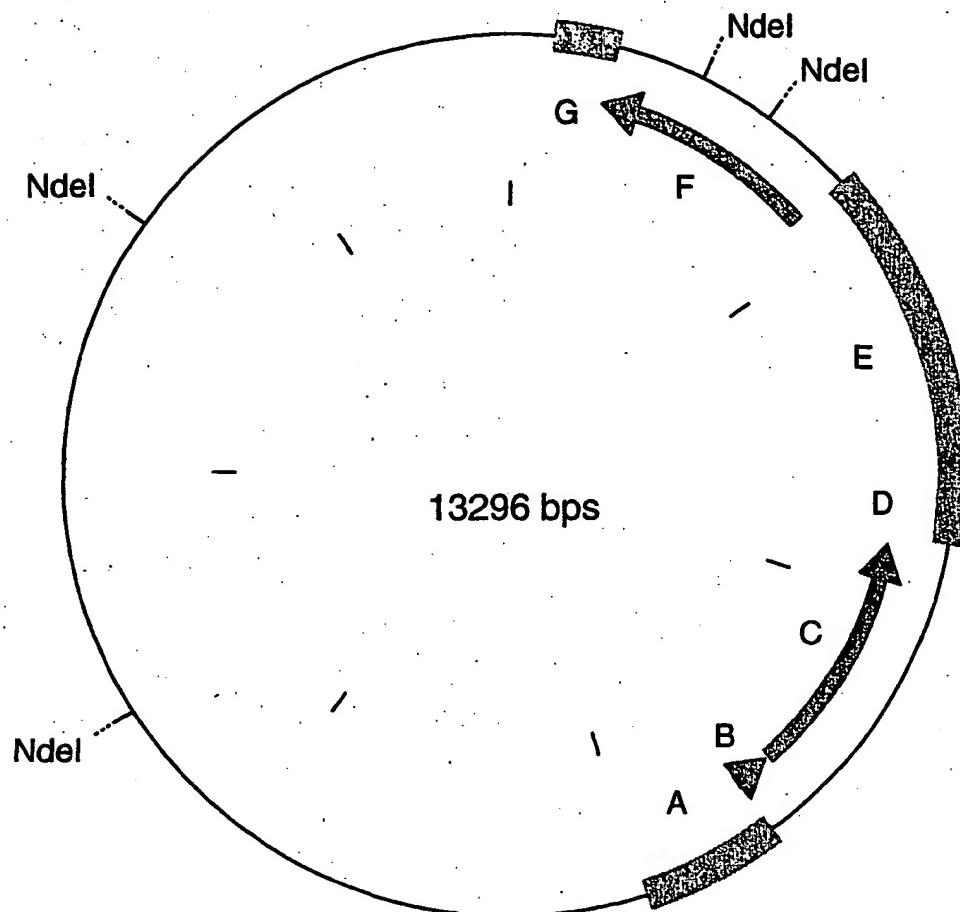


42/63

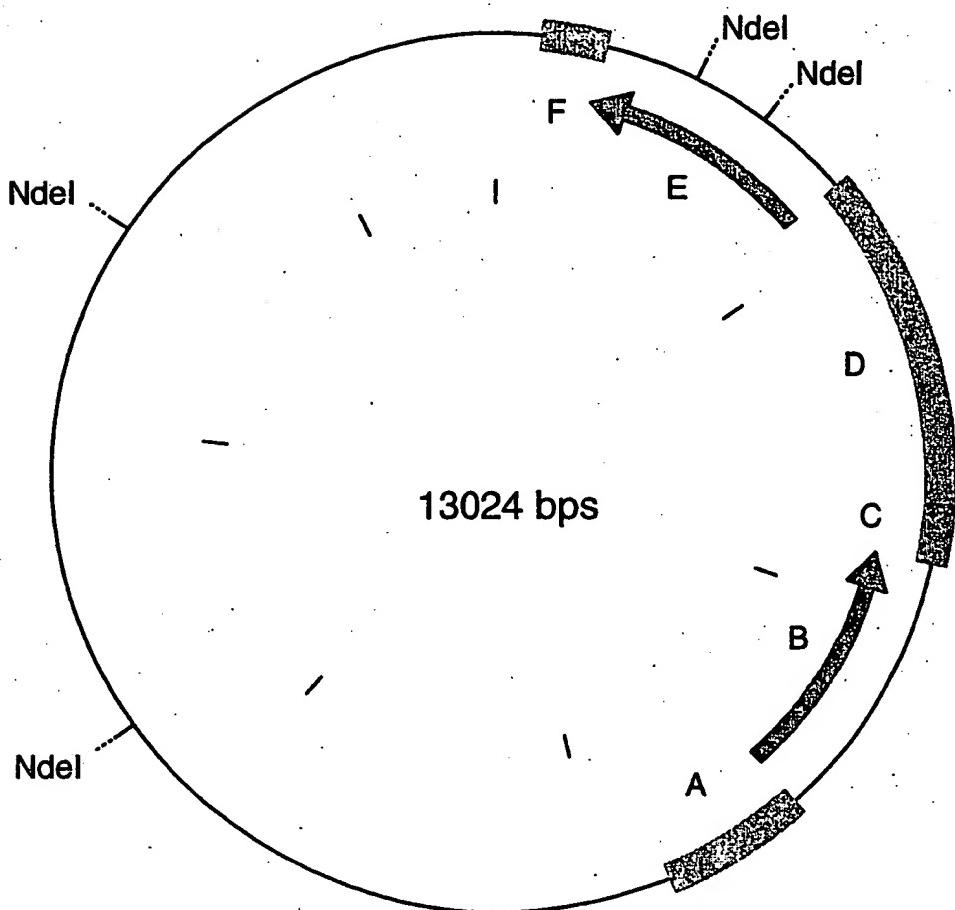
Abbildung 42: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase6-nosT



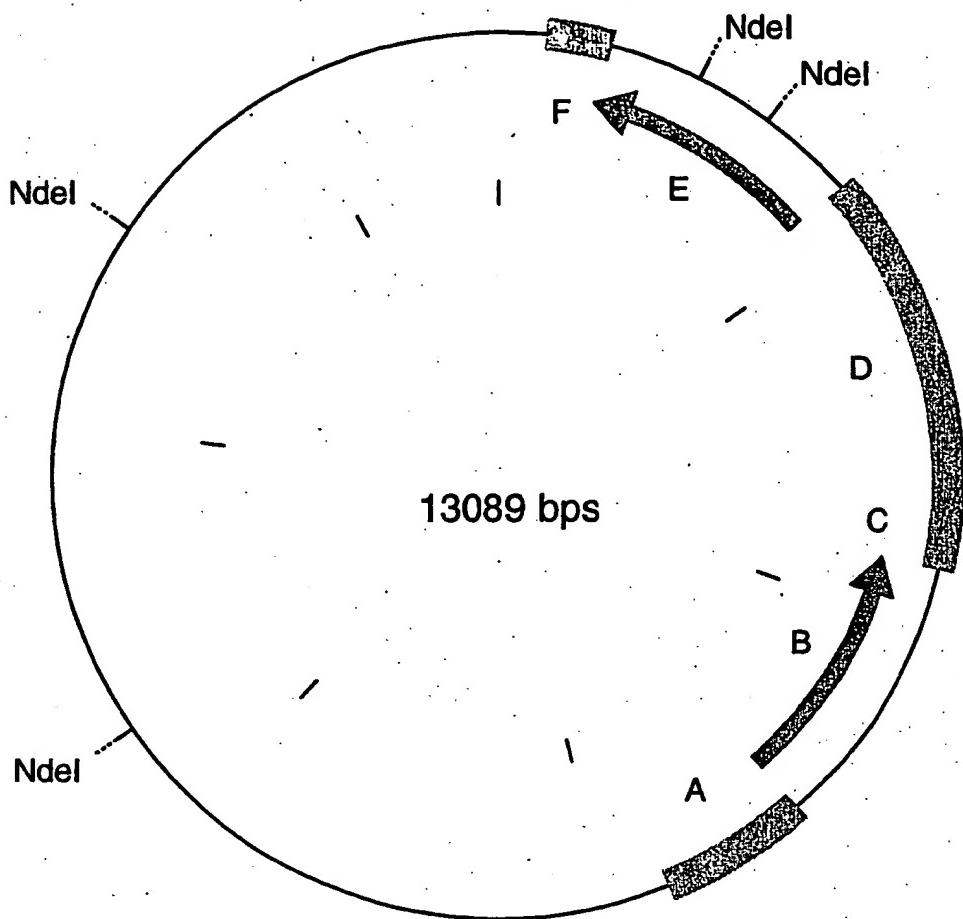
43/63

Abbildung 43: pSUM2-SBPP-At γ TMT-nosT-USPP-rbcS-RnTATase-nosT

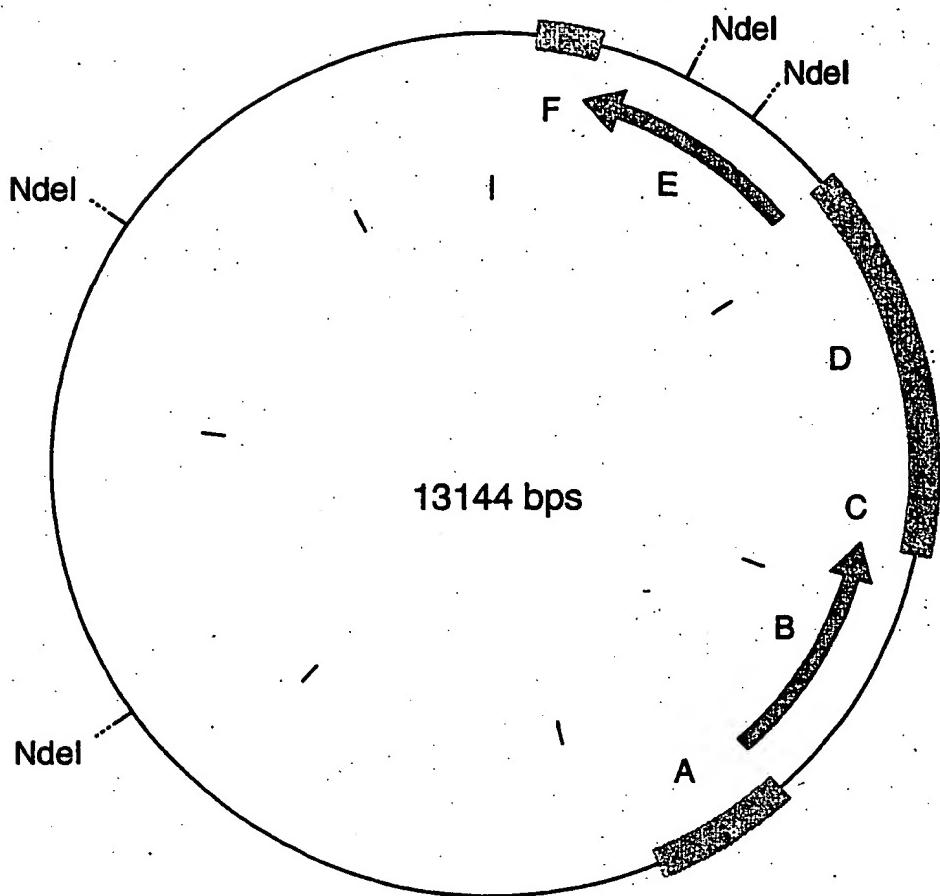
44/63

Abbildung 44: pSUN2-SBP-At γ TMT-nosT-USPP-AttATase1-nosT

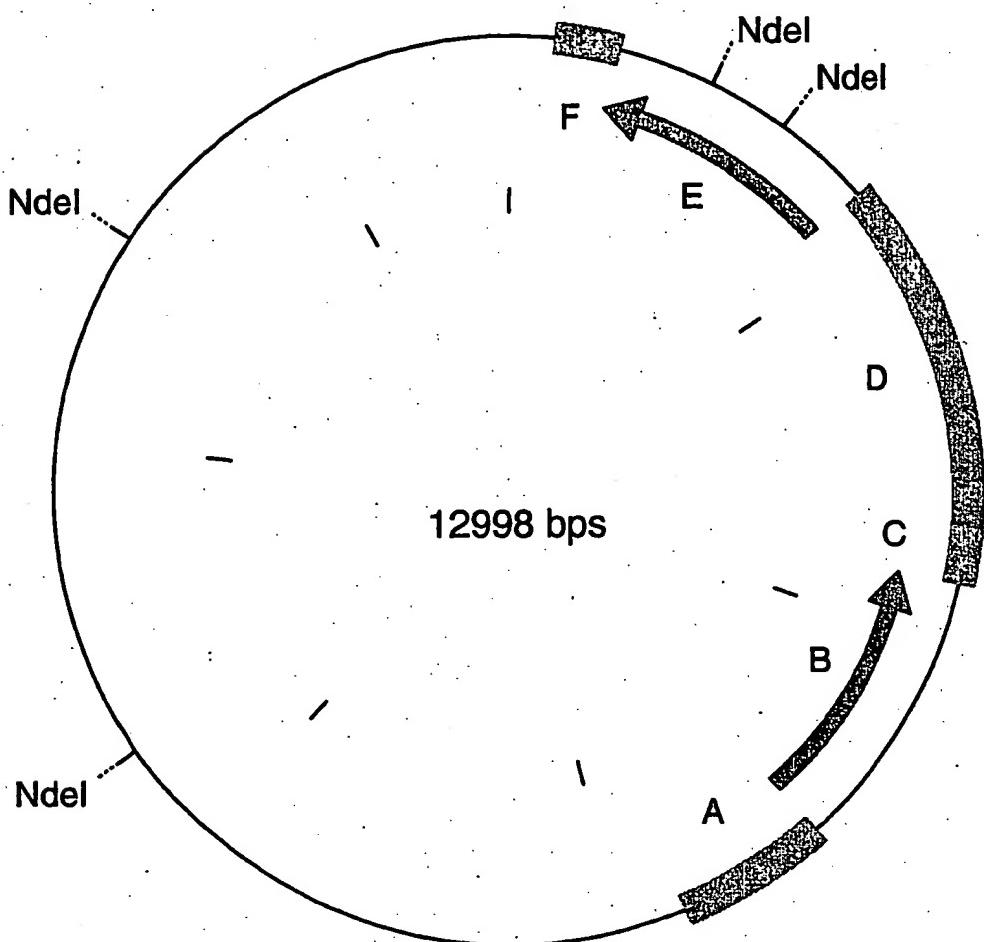
45/63

Abbildung 45: pSUN2-SBP-At γ TMT-nosT-USPP-AttATase3-nosT

46/63

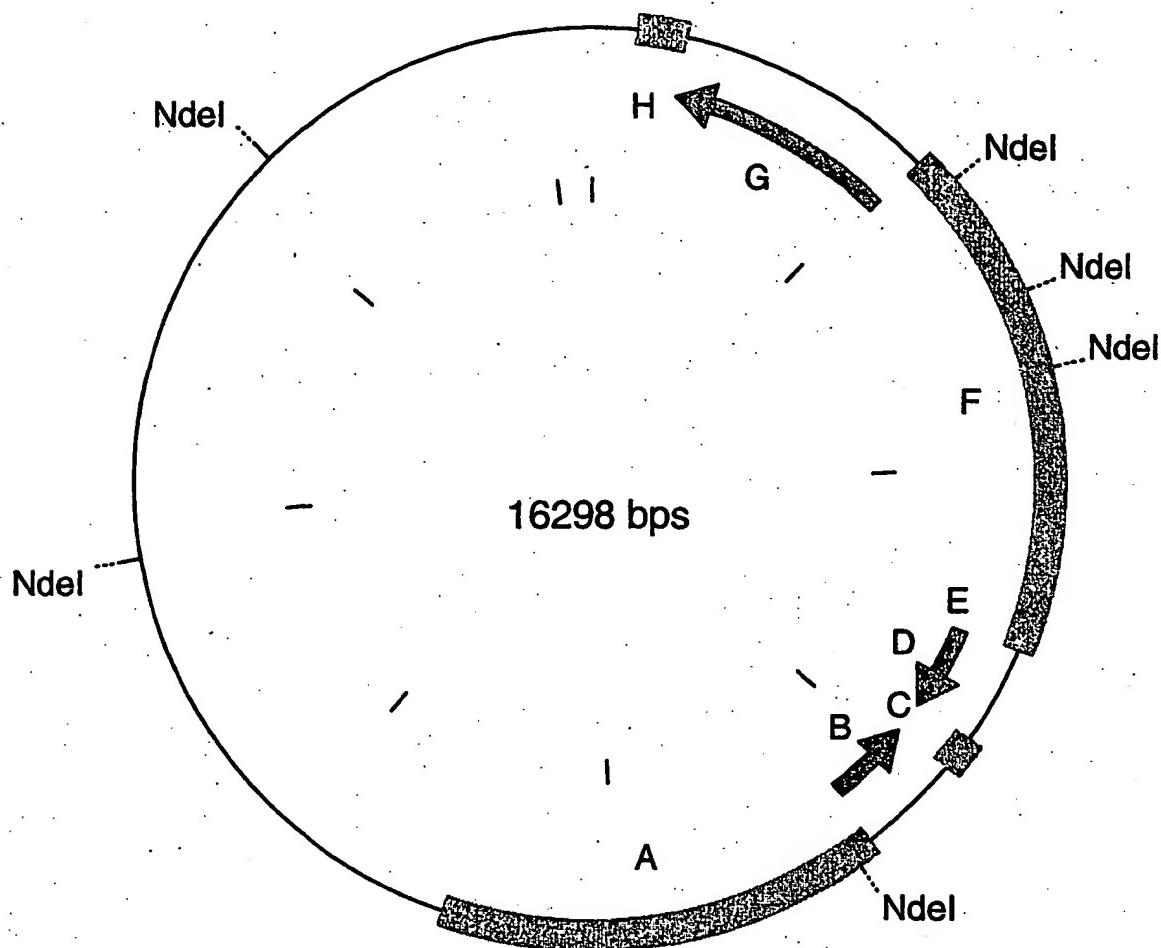
Abbildung 46: pSUM2-SBP-At γ TMT-nost-USPP-AttATase5-nost

47/63

Abbildung 47: pSUN2-SBP-At γ TMT-nosT-USPP-AtTATase6-nosT

48/63

Abbildung 48:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-LeB4-NtGGPPOR-nosT

49/63

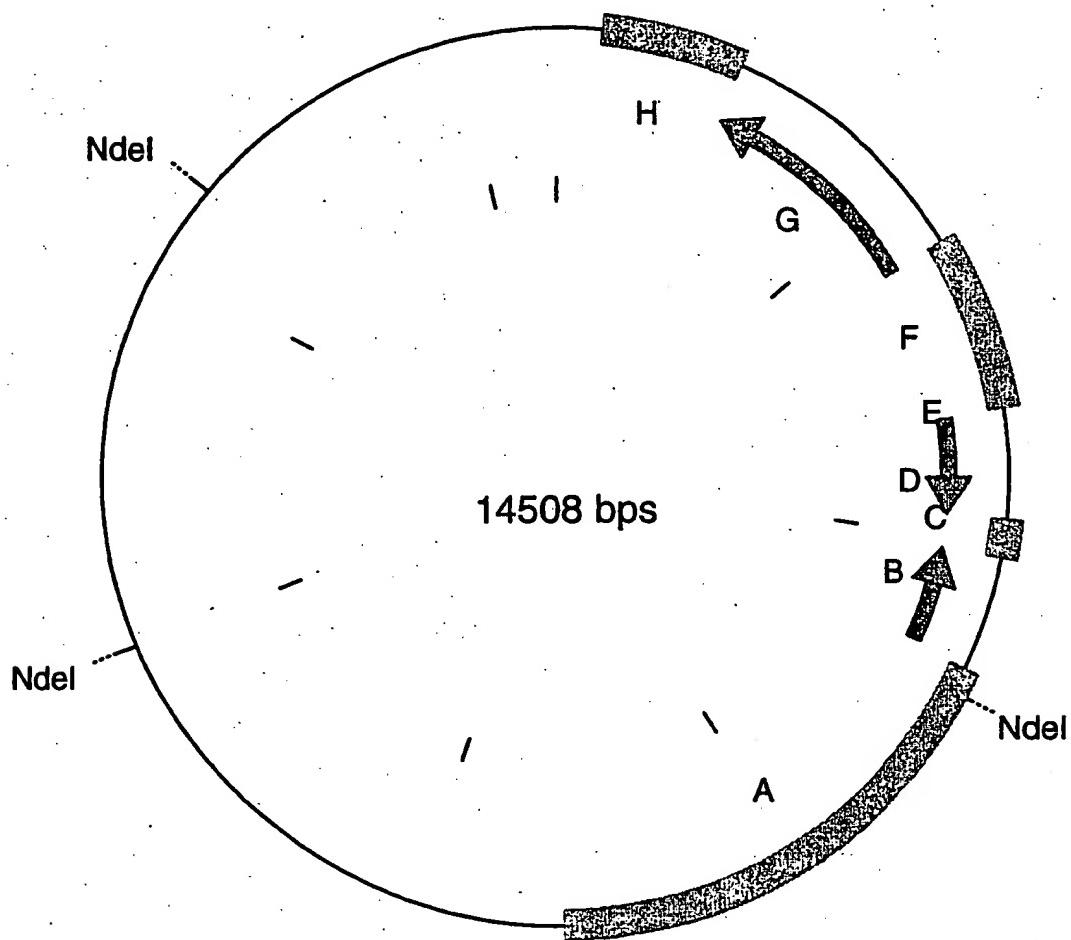
Abbildung 49:**pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-AthPPD-ocsT**

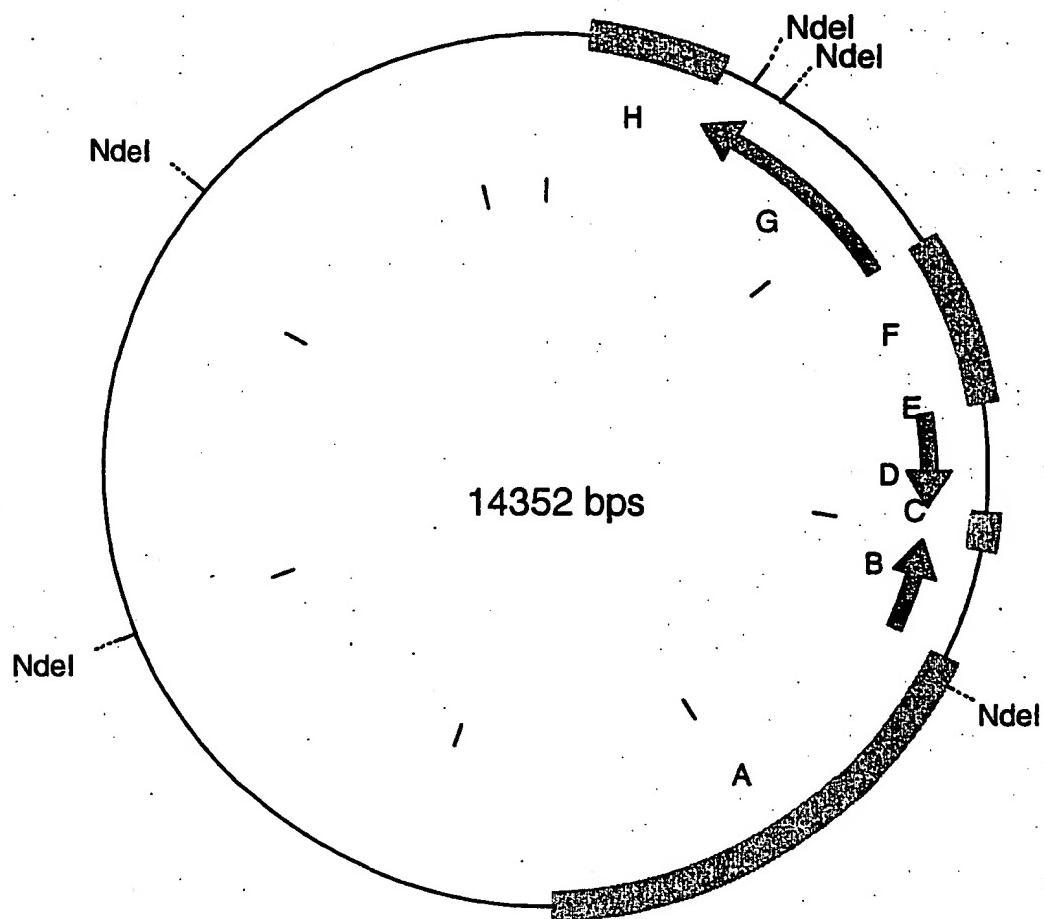
Abbildung 50:**pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST-USPP-AtHPT-ocST**

Abbildung 51:

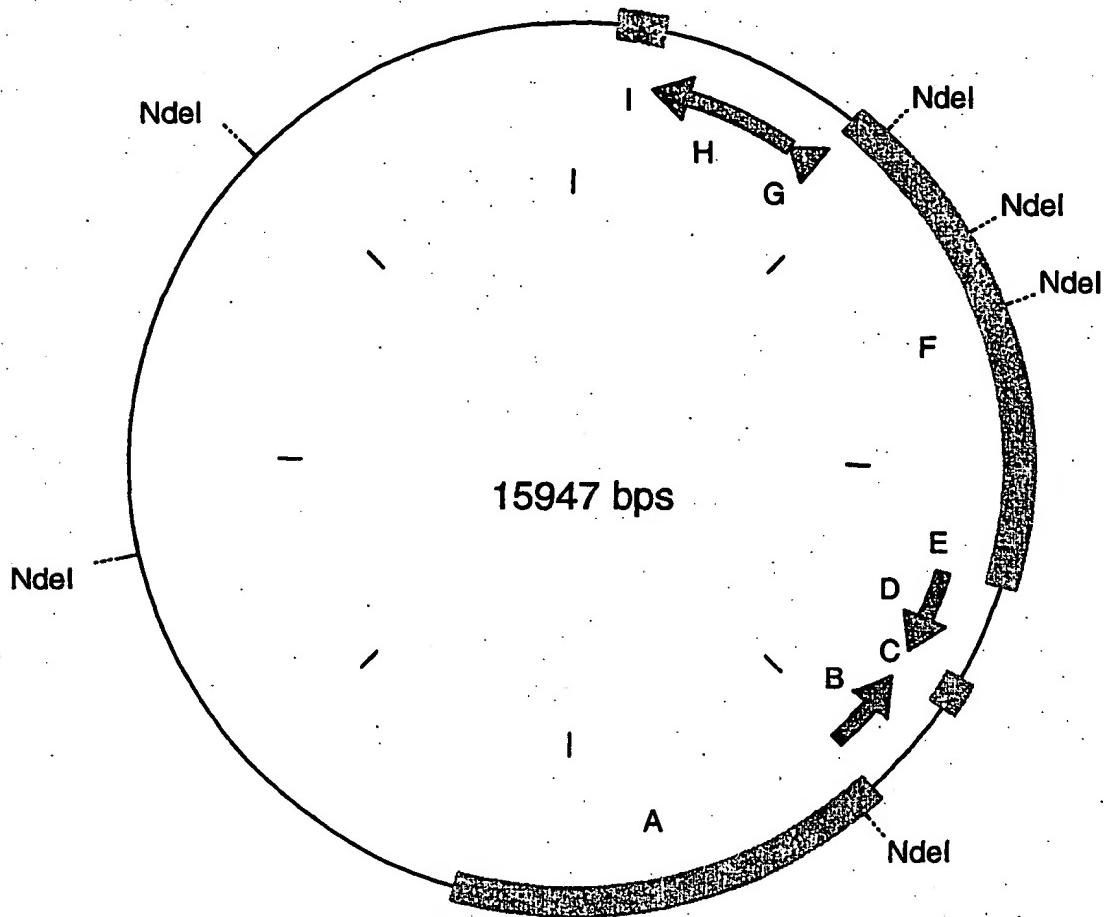
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocST-LeB4-IPP-SynMT1-nosT

Abbildung 52:

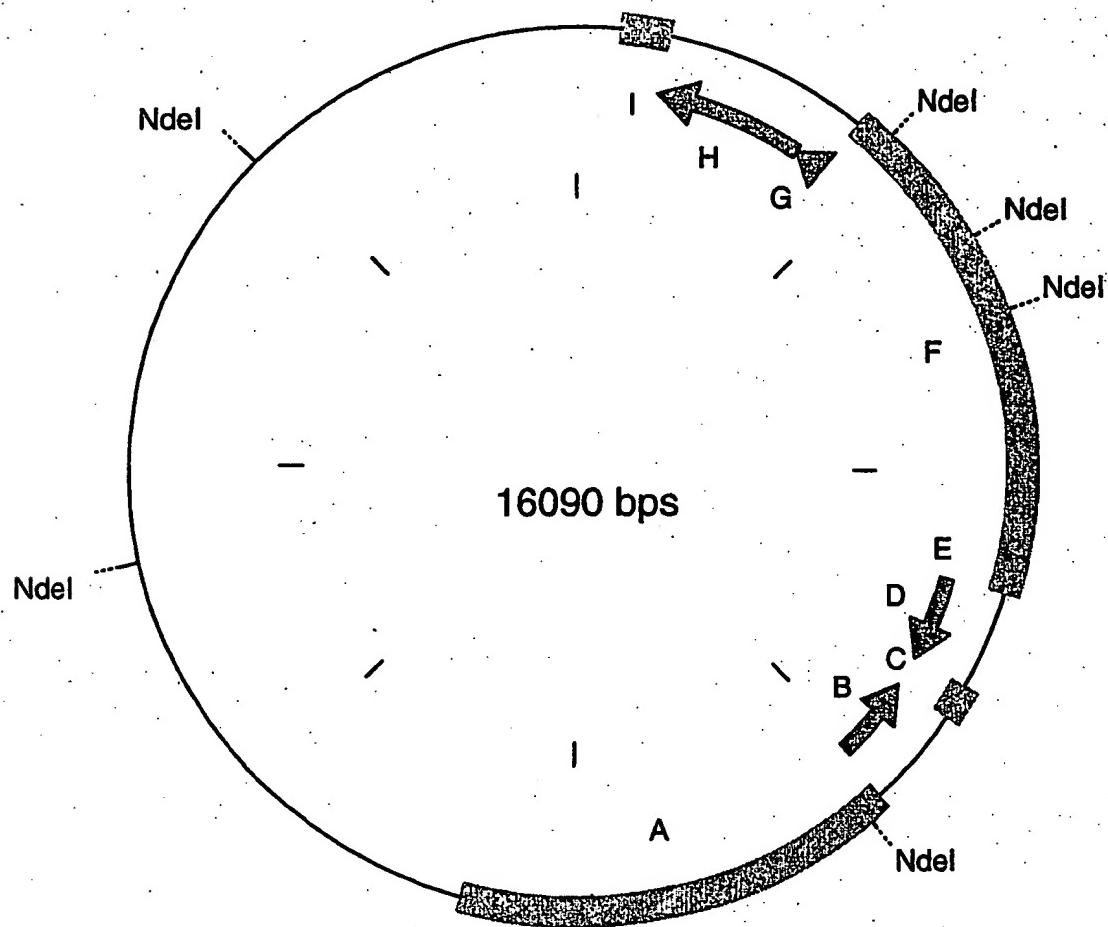
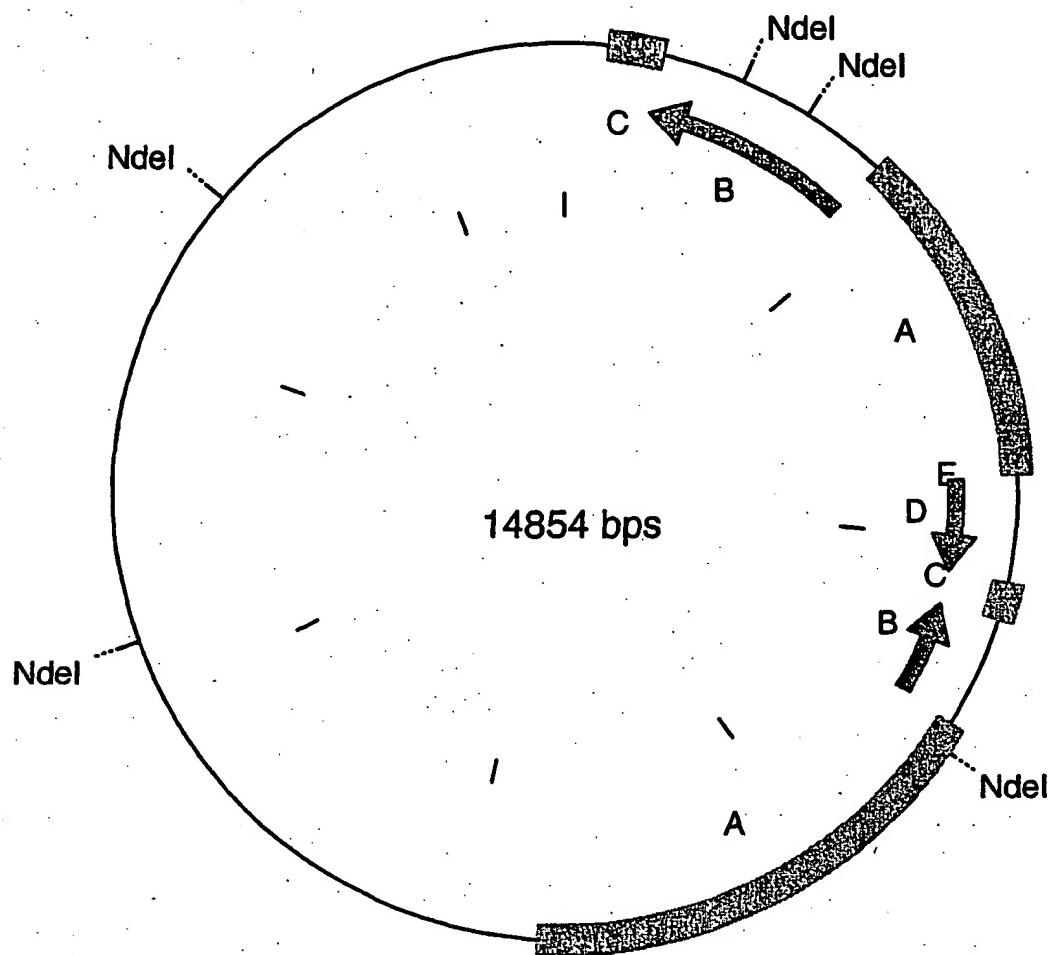
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-LeB4-IPP-SynMT1-nosT

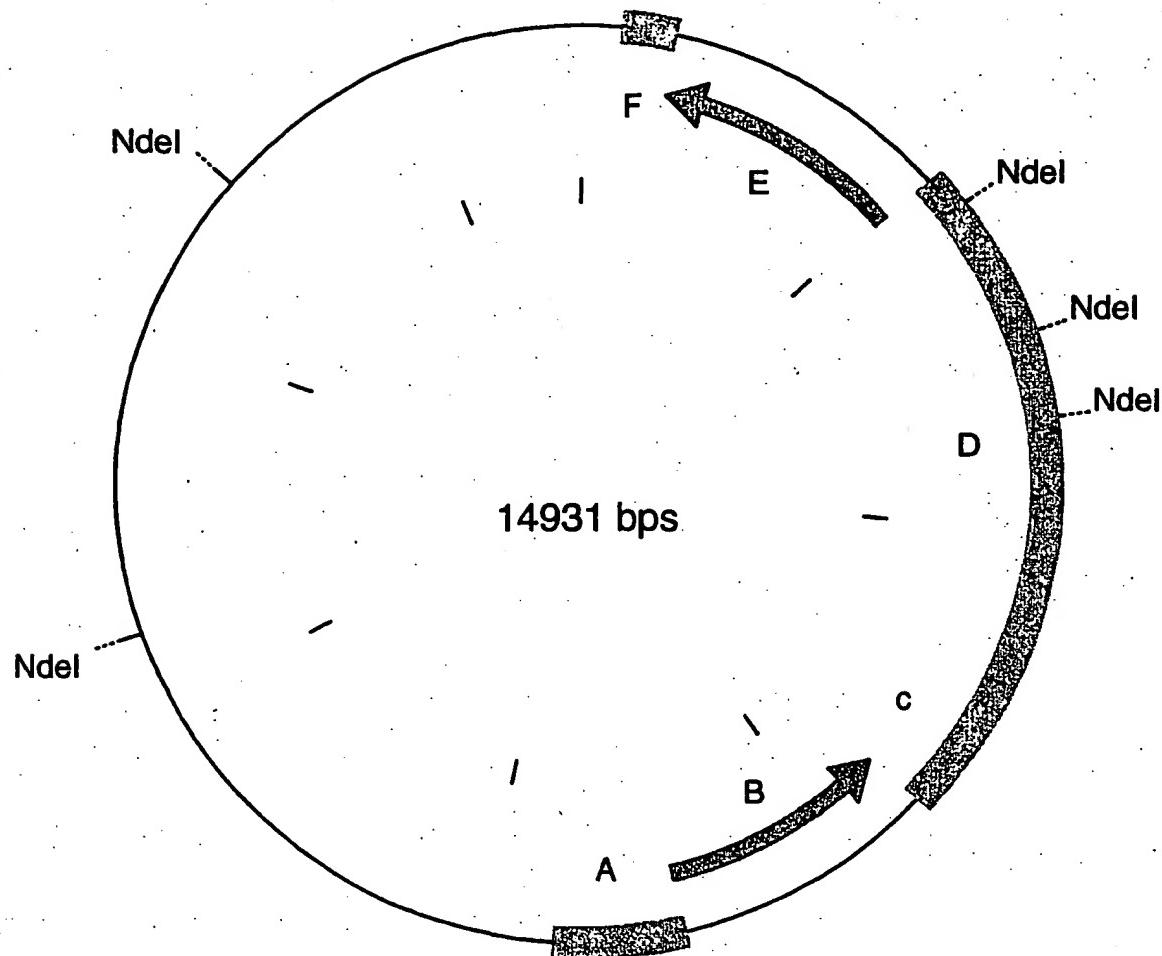
Abbildung 53:

DSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-SBPP-At γ TMT-35st



54/63

Abbildung 54: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtHPPD-ocST



55/63

Abbildung 55: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtHPT-ocST

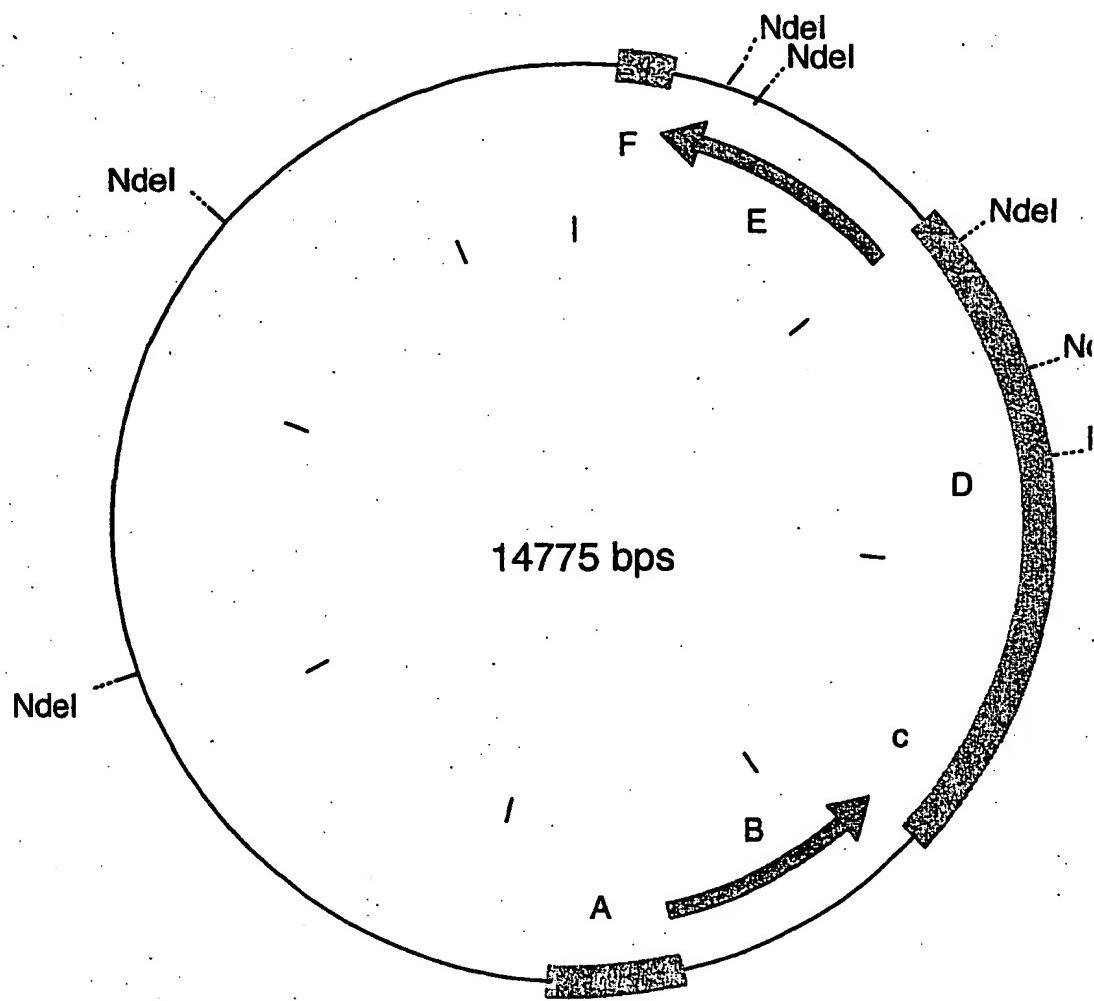
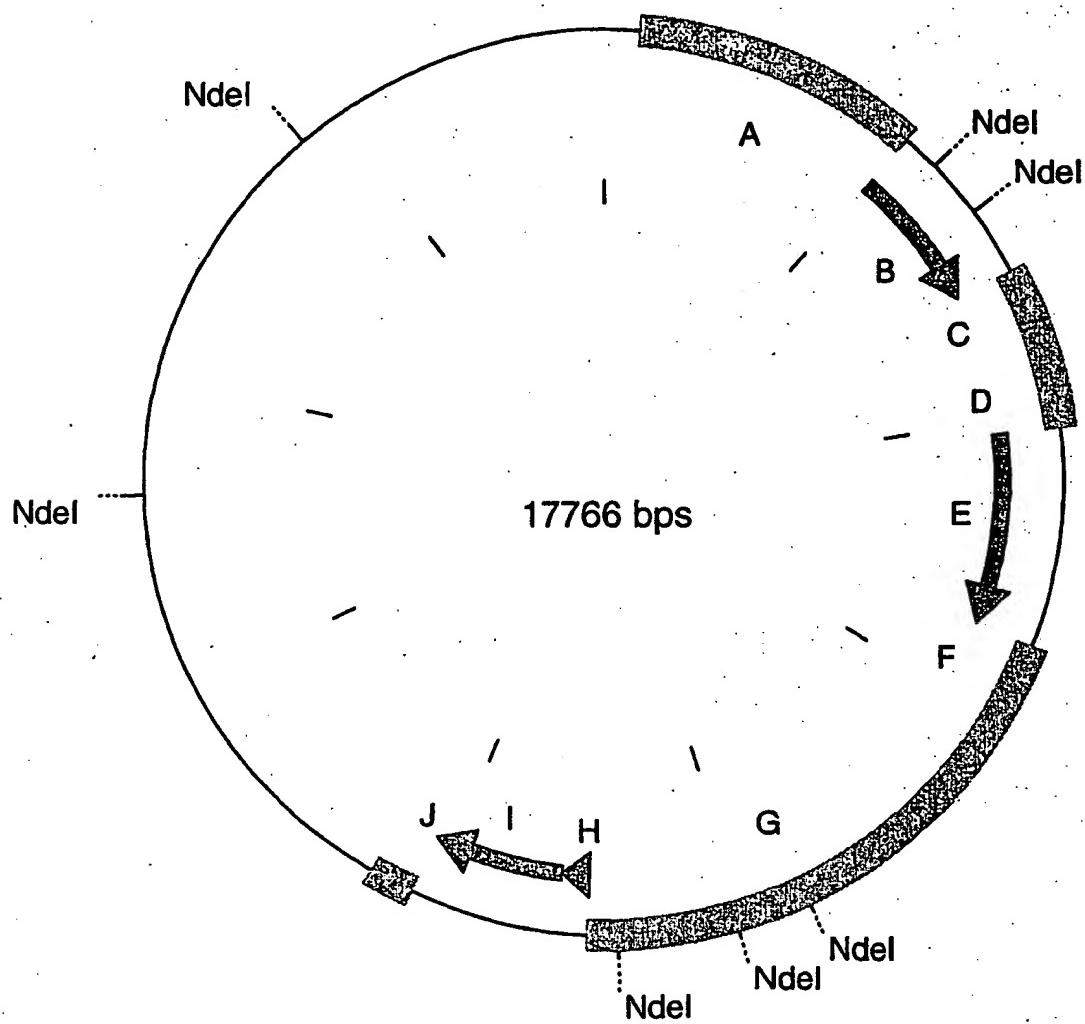


Abbildung 56:

pSUN2-SBPP-AtgTMT-35sT-USPP-AtHPPD-ocST-LeB-SynMT1-nost



57/63

Abbildung 57:

pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT-LeB-SynMT1-nosT

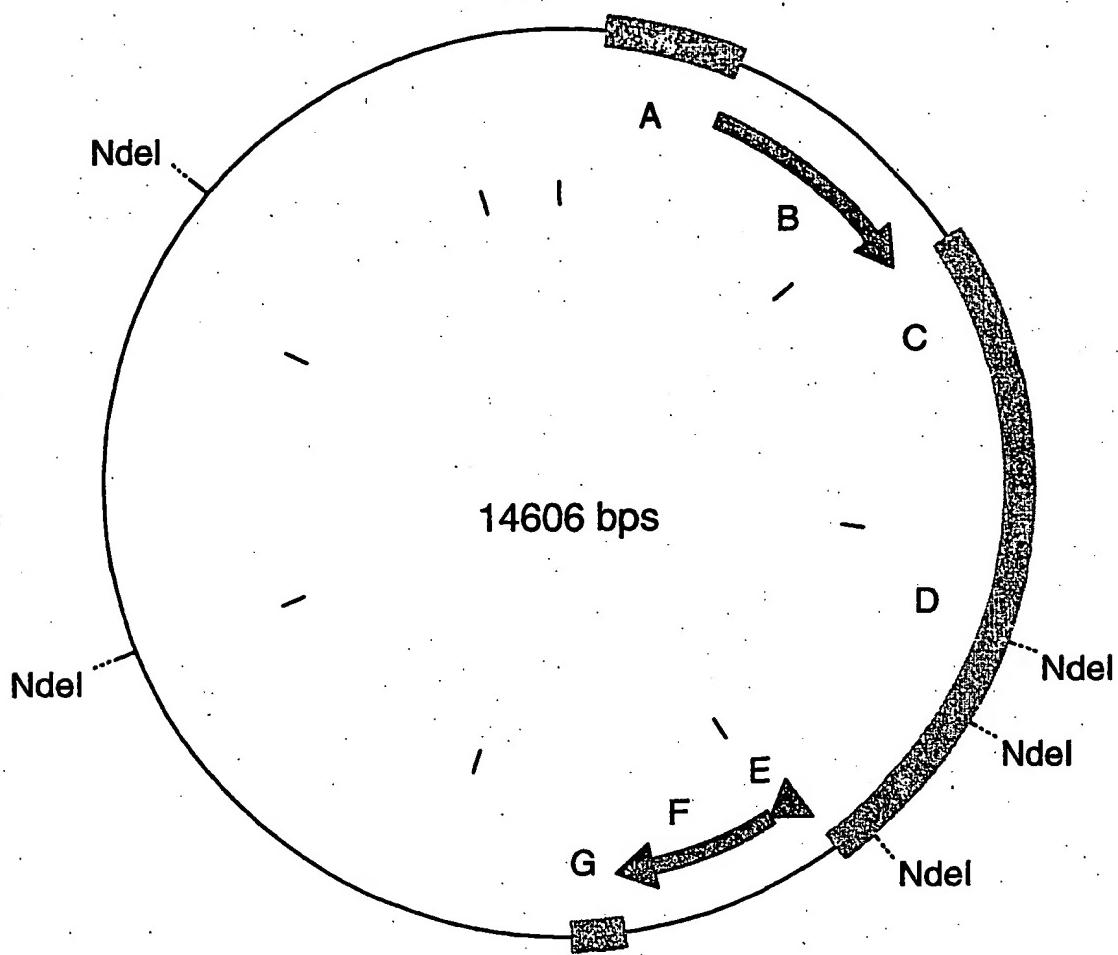
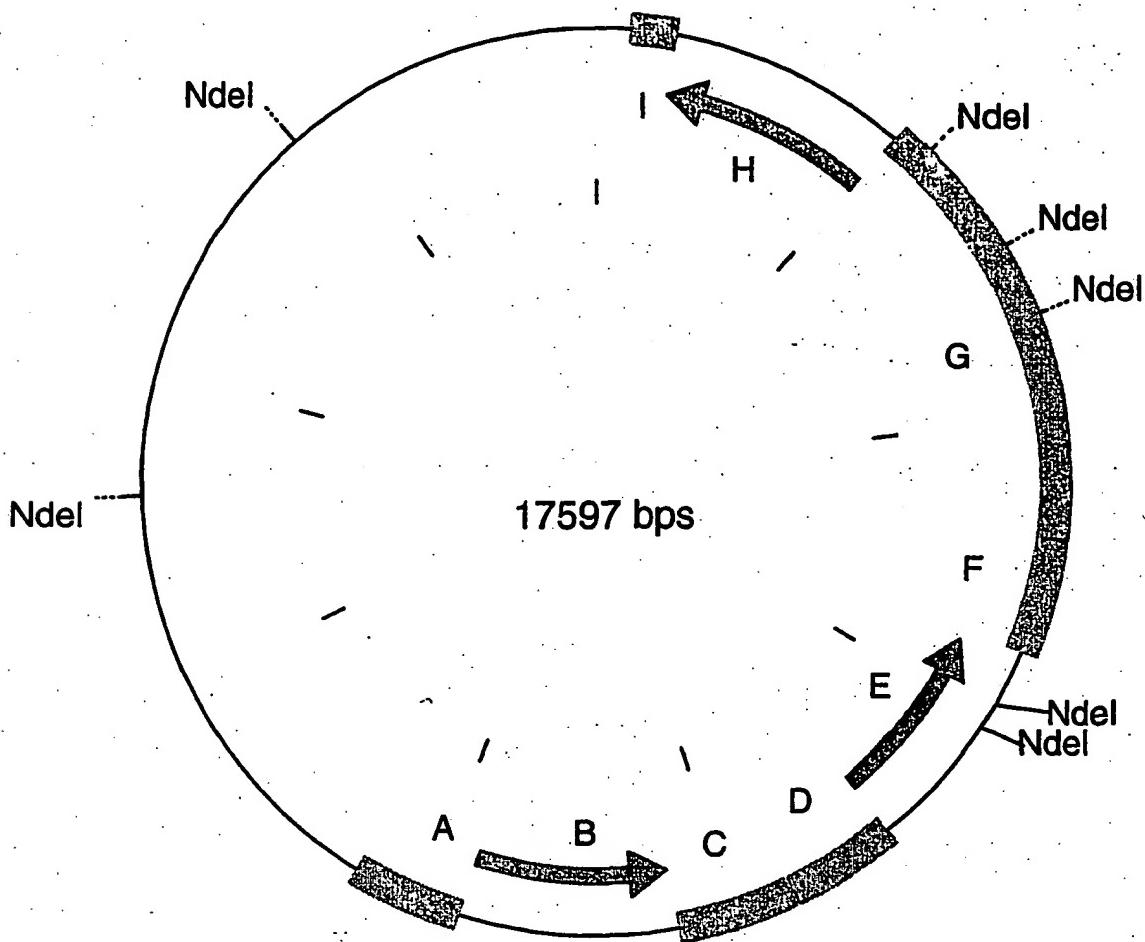


Abbildung 58:

pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtHPT-ocsT



59/63

Abbildung 59:

pSUN2-SBP-AtyTMT-35sT-LeB4-IPP-SynCyc-nosT-LeB4-IPP-
SynMT1-nosT

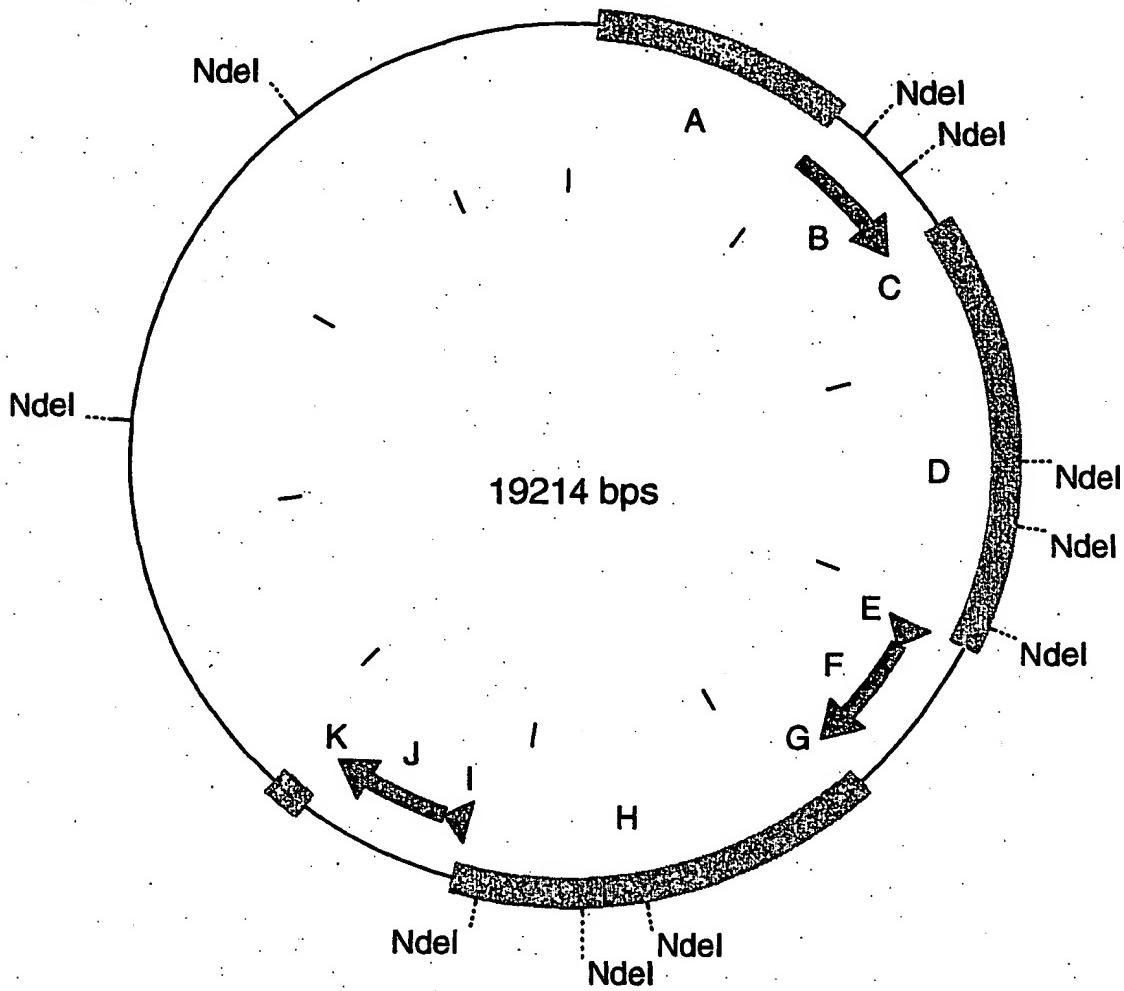
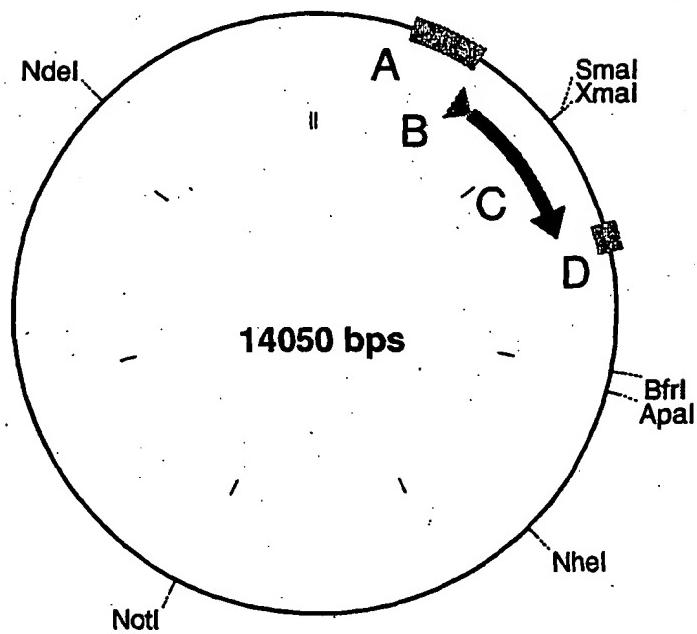


Abbildung 60

pBinAR-IPP-TP10-TATaseRN-ocs

61/63

Abbildung 61:

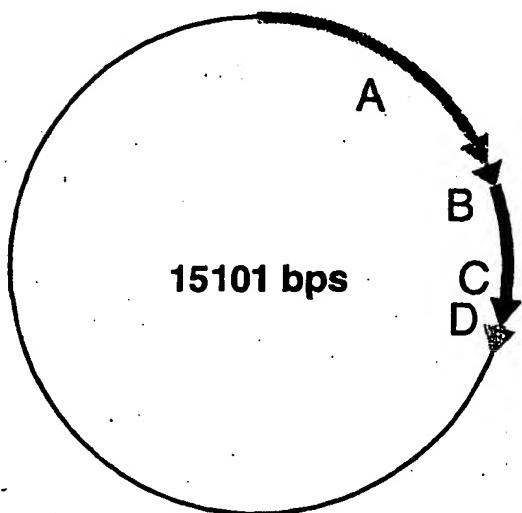
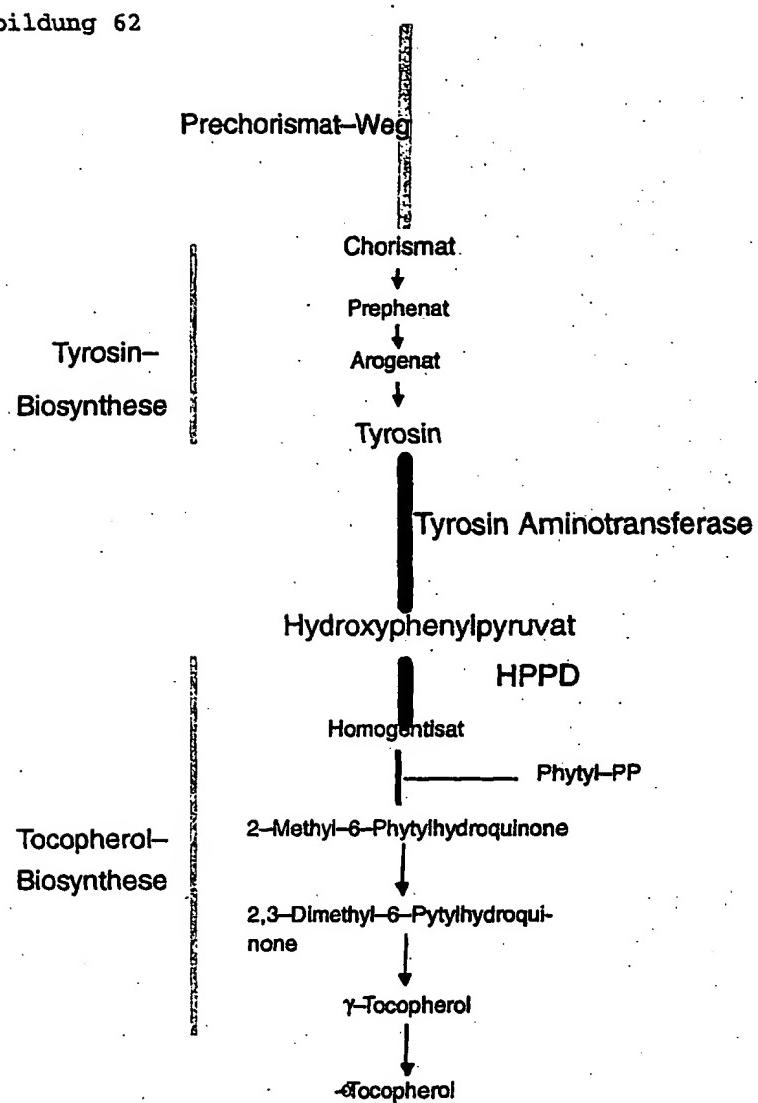
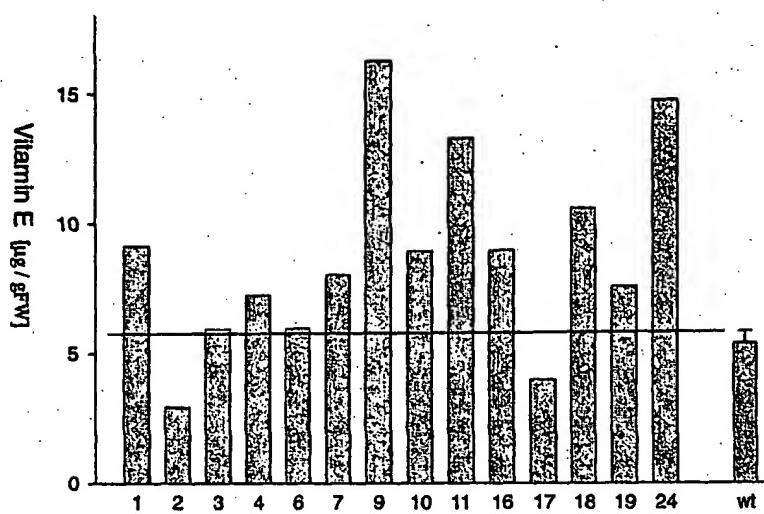
pPTVkanLeP-IPPTp11-TATaseRN

Abbildung 62



63/63

Abbildung 63



SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co. KGaA

<120> Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

<130> 0817/00021

5140>

<141>

<160> 58

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1377

~~52123~~ DNA

<213> Battus norvegicus

<220>

5221 > CDS

<222> (1) .. (1371)

<400> 1

gat atc atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg
 Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu
 1 5 10 15

48

tcc tca gtt ctg gat gtg cat gtc aat att ggt ggg aga aac tcg gta
 Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val
 20 25 30

96

caa gga aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct
Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser
 35 40 45

144

gac atg tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac
Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn
50 55 60

192

atg aag gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att
Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile
65 70 75 80

240

ggg gac cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc
 Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr
 85 90 95

caa gcc atg aaa gat gcc ctg gac tcg ggg aag tac aat ggc tat gcc 336
 Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala
 100 105 110

 ccg tcc atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac 384
 Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr
 115 120 125

 cac tgt cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc 432
 His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser
 130 135 140

 ggc tgc agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct 480
 Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro
 145 150 155 160

 gga caa aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act 528
 Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr
 165 170 175

 ttg gct gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg cct 576
 Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro
 180 185 190

 gag aag tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat 624
 Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp
 195 200 205

 gaa aaa aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc 672
 Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly
 210 215 220

 tcc gtg ttc agt aag cga cac ctt cag aag att ttg gca gtg gct gaa 720
 Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu
 225 230 235 240

 agg cag tgt gtc ccc atc tta gct gac gag atc tat ggt gac atg gtg 768
 Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val
 245 250 255

 ttt tca gat tgc aaa tac gaa cca ctg gcc aac ctc agc acc aat gtt 816
 Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val
 260 265 270

 ccc atc ctg tcc tgt ggt ggg ctg gcc aag cgc tgg ctg gtt cct ggc 864
 Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly
 275 280 285

 tgg agg ttg ggc tgg atc ctc att cat gat cga aga gac att ttt ggc 912
 Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly

290	295	300	
aat gag att cga gac ggg ctg gtg aaa ctg agt cag cg	atc ctg gga		960
Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly			
305	310	315	320
cca tgc acc ata gtc cag ggt gct ctg aag agc atc ctt cag cga acc			1008
Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr			
325	330	335	
cct cag gag ttc tat cac gac acg tta agc ttc ctc aag tcc aat gcg			1056
Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala			
340	345	350	
gac ctc tgc tat ggg gca ctg gct gcc atc cct gga ctc cag ccg gtc			1104
Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val			
355	360	365	
cgc cct tct gga gcc atg tac ctt atg gtg gga att gag atg gag cat			1152
Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His			
370	375	380	
ttc ccg gaa ttc gag aac gac gtg gag ttc aca gag cgg ttg att gcg			1200
Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala			
385	390	395	400
gag cag gct gtc cac tgt ctc cca gca acg tgc ttc gag tac cca aat			1248
Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn			
405	410	415	
ttc ttc cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct			1296
Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala			
420	425	430	
tgt agc cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa			1344
Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu			
435	440	445	
ggc agc cag gag gag tgt gac aaa taa gatatc			1377
Gly Ser Gln Glu Cys Asp Lys			
450	455		
<210> 2			
<211> 456			
<212> PRT			
<213> Rattus norvegicus			
<400> 2			
Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu			

1 5 10 15

Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val
20 25 30

Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser
35 40 45

Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn
50 55 60

Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile
65 70 75 80

Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr
85 90 95

Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala
100 105 110

Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr
115 120 125

His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser
130 135 140

Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro
145 150 155 160

Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr
165 170 175

Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro
180 185 190

Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp
195 200 205

Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly
210 215 220

Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu
225 230 235 240

Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val
245 250 255

Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val
260 265 270

Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly
 275 280 285

Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly
 290 295 300

Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly
 305 310 315 320

Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr
 325 330 335

Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala
 340 345 350

Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val
 355 360 365

Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His
 370 375 380

Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala
 385 390 395 400

Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn
 405 410 415

Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala
 420 425 430

Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu
 435 440 445

Gly Ser Gln Glu Glu Cys Asp Lys
 450 455

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<400> 3

atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg tcc tca 48
 Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser

gtt ctg gat gtg cgt gtc aat gtt ggt ggg aga aac tcg gta caa gga Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly	96
20 25 30	
aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct gac atg Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met	144
35 40 45	
tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac atg aag Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys	192
50 55 60	
gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att ggg gac Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp	240
65 70 75 80	
cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc caa gcc Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala	288
85 90 95	
atg aaa gat gcc ctg gac tcg ggg aag tac aat ggc tat gcc ccg tcc Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser	336
100 105 110	
atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac cac tgt Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys	384
115 120 125	
cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc ggc tgc His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys	432
130 135 140	
agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct gga caa Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln	480
145 150 155 160	
aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act ttg gct Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala	528
165 170 175	
gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg ccc gag aag Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys	576
180 185 190	
tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat gaa aaa Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys	624
195 200 205	
aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc tcc gtg	672

Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly Ser Val
 210 215 220

ttc agt aag cgg cac ctt cag aag att ttg gca gtg gct gaa agg cag 720
 Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu Arg Gln
 225 230 235 240

tgt gtc ccc atc tta gct gac gag atc tat ggt gac atg gtg ttt tca 768
 Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val Phe Ser
 245 250 255

gac tgc aaa tac gaa cca ctg gcc aac ctc agc acc aat gtt ccc atc 816
 Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val Pro Ile
 260 265 270

ctg tcc tgt ggt ggg ctg gcc aag cgc tgg ctg gtt cct ggc tgg agg 864
 Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly Trp Arg
 275 280 285

ttg ggc tgg atc ctc att cat gat cga aga gac att ttt ggc aat gag 912
 Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly Asn Glu
 290 295 300

att cga gac ggg ctg gtg aaa ctg agt cag cgg atc ctg gga cca tgc 960
 Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly Pro Cys
 305 310 315 320

acc ata gtc cag ggt gct ctg aag agc atc ctt cag cga acc cct cag 1008
 Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr Pro Gln
 325 330 335

gag ttc tat cac gac acg tta agc ttc ctc aag tcc aat gcg gag ctc 1056
 Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala Asp Leu
 340 345 350

tgc tat ggg gca ctg gct gcc atc cct gga ctc cag ccg gtc cgc cct 1104
 Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val Arg Pro
 355 360 365

tct gga gcc atg tac ctt atg gtg gga att gag atg gag cat ctc ccg 1152
 Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His Leu Pro
 370 375 380

gaa ttc gag aac gac gtg gag ttc aca gag cgg ttg att gcg gag cag 1200
 Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gln
 385 390 395 400

gct gtc cac tgt ctc cca gca acg tgc ttc gag tac cca aat ttc ttc 1248
 Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn Phe Phe
 405 410 415

cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct tgt agc 1296
 Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser
 420 425 430

cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa ggc agc 1344
 Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser
 435 440 445

cag gag gag tgt gac aaa taa 1365
 Gln Glu Glu Cys Asp Lys
 450 455

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly
 20 25 30

Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met
 35 40 45

Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys
 50 55 60

Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala
 85 90 95

Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser
 100 105 110

Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys
 115 120 125

His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys
 130 135 140

Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln
 145 150 155 160

Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala
 165 170 175

Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys
 180 185 190

Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys
 195 200 205

Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly Ser Val
 210 215 220

Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu Arg Gln
 225 230 235 240

Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val Phe Ser
 245 250 255

Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val Pro Ile
 260 265 270

Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly Trp Arg
 275 280 285

Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly Asn Glu
 290 295 300

Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly Pro Cys
 305 310 315 320

Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr Pro Gln
 325 330 335

Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala Asp Leu
 340 345 350

Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val Arg Pro
 355 360 365

Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His Leu Pro
 370 375 380

Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gln
 385 390 395 400

Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn Phe Phe
 405 410 415

Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser
 420 425 430

Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser
435 440 445

Gln Glu Glu Cys Asp Lys
450

<210> 5
<211> 1269
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1269)

<400> 5
atg gca acc ctt aag tgc att gat tgg caa ttc agc gga agc gag gcg 48
Met Ala Thr Leu Lys Cys Ile Asp Trp Gln Phe Ser Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

96
 gcc aaa gat gct gct gcg gcc tcc tta ggc tca tat acc tct gca ctc
 Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Ser Ala Leu
 20 25 30

tat gcc ctg tgc gat cct cat ggc aaa ccc att ttg ccc cca cga aat 144
 Tyr Ala Leu Cys Asp Pro His Gly Lys Pro Ile Leu Pro Pro Arg Asn
 35 40 45

gag atc ctg gag acc agc aat aca gcc gaa aaa gca gtt gtt aaa gct 192
 Glu Ile Leu Glu Thr Ser Asn Thr Ala Glu Lys Ala Val Val Lys Ala
 50 55 60

gtt ctt tat ggc tcg gga aac gcc tat gct cct agc tta ggc ctc gcg 240
 Val Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Ala Tyr Ala Pro Ser Leu Gly Leu Ala
 65 70 75 80

gcc gcc aaa agt gcc gta gca gag tat cta aac caa ggt ctt cca aag
 Ala Ala Lys Ser Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Gly Leu Pro Lys
 85 90 95

aag ctt acc gca gat gac gtg ttt atg act ctg gga tgc aaa caa gct 336
 Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala
 100 105 110

att gag ctc gcg gta gac att ctc gct aaa ccg aaa gcc aac gtt ttg
 Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu
 115 120 125

ctt ccg agt ccc ggc ttc cca tgg gac cta gtc cgc tcc atc tac aag 432
 Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys
 130 135 140

aac ctt gag gtc cgc cac tat aat ttc ctt cca gaa aag aac ttt gaa 480
 Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu
 145 150 155 160

atc gac ttt gat agc gtc cga gcg ctc gtg gac gag aac aca ttt gcc 528
 Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala
 165 170 175

ata ttt ata atc aac ccc cac aac ccc aat ggt aac acc tac tcc gag 576
 Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu
 180 185 190

gct cat ctc aaa cag ctg gct gaa ctg gct aag gaa ctc aag att atg 624
 Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met
 195 200 205

gtg gtt tct gac gag gtt ttt aga tgg aca ctc ttt ggt agt aac cct 672
 Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro
 210 215 220

ttt gtt cct atg gga aaa ttc tcg tcg atc gta cca gtg gtt aca ctc 720
 Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu
 225 230 235 240

gga tcc ata tca aag gga tgg aaa gtc cca gga tgg cga act ggt tgg 768
 Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp
 245 250 255

ctc acg cta cat gat cta gac ggt gtc ttc aga aac acc aag gtc tta 816
 Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu
 260 265 270

caa gct gct caa gat ttt ctc cag ata aac aat aac cct ccg aca gtt 864
 Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Pro Pro Thr Val
 275 280 285

atc cag gcg gct att cct gac atc ttg gag aaa act cct caa gag ttt 912
 Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe
 290 295 300

ttt gat aag agg cag agt ttt ctg aaa gat aaa gta gaa ttt ggt tat 960
 Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr
 305 310 315 320

tct aag ctc aag tac att cct agc ctc act tgc tac atg aaa ccc gaa 1008
 Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu

12

325

330

335

gcc tgc acc ttc tta tgg acc gag ctt gat tta tcg agc ttt gtg gac 1056
 Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp
 340 345 350

atc gaa gac gat caa gac ttt tgc aat aag ctt gct aaa gaa gaa aac 1104
 Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn
 355 360 365

ctc gtc gtt tta cca ggg att gca ttc agt cag aag aac tgg ttg agg 1152
 Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg
 370 375 380

cat tct atc gat atg gag act ccg gta ttg gag gat gca ttg gaa aga 1200
 His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg
 385 390 395 400

ttg aag agc ttc tgc gat cgc cat tcc aac aaa aaa gct ccc ctc aaa 1248
 Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys
 405 410 415

gac gtc aat ggt gtt aag taa 1269
 Asp Val Asn Gly Val Lys
 420

<210> 6

<211> 422

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Thr Leu Lys Cys Ile Asp Trp Gln Phe Ser Gly Ser Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Ser Ala Leu
 20 25 30

Tyr Ala Leu Cys Asp Pro His Gly Lys Pro Ile Leu Pro Pro Arg Asn
 35 40 45

Glu Ile Leu Glu Thr Ser Asn Thr Ala Glu Lys Ala Val Val Lys Ala
 50 55 60

Val Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Ala Tyr Ala Pro Ser Leu Gly Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Ser Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Gly Leu Pro Lys
 85 90 95

Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala
100 105 110

Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu
115 120 125

Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys
130 135 140

Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu
145 150 155 160

Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala
165 170 175

Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu
180 185 190

Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met
195 200 205

Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro
210 215 220

Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu
225 230 235 240

Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp
245 250 255

Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu
260 265 270

Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Asn Pro Pro Thr Val
275 280 285

Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe
290 295 300

Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr
305 310 315 320

Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu
325 330 335

Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp
340 345 350

Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn

355

360

365

Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg
 370 375 380

His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg
 385 390 395 400

Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Gly Val Lys

420

<210> 7

<211> 1334

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1332)

<400> 7

atg gcg agc aac gga gtt acc aac tgt aac gca aac gcc aat gtt tgg
 Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp
 1 5 10 15

48

cgg ttc aaa gga aac ggt gca acg agt gat gcg acg gct gtg acg ttg
 Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu
 20 25 30

96

aga aag ctt gct ttt ggg atg ttt aaa aac tgc acc atg aac agt gga
 Arg Lys Leu Ala Phe Gly Met Phe Lys Asn Cys Thr Met Asn Ser Gly
 35 40 45

144

aag acc att ttg ttc cca act ccc ggc gag ccc tcc gcc cat tcc aac
 Lys Thr Ile Leu Phe Pro Thr Pro Gly Glu Pro Ser Ala His Ser Asn
 50 55 60

192

ttc agg act tgc ccg gaa gcc gag gaa gcc gtt gcc gac gct gca cgc
 Phe Arg Thr Cys Pro Glu Ala Glu Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg
 65 70 75 80

240

tcc ggc atg gct aac tct tac gca ccc agc cct gga gtt ttc aag gct
 Ser Gly Met Ala Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Pro Gly Val Phe Lys Ala
 85 90 95

288

aga agg gcg gtg gct gaa tat tta aac gga gaa ctt ccg acg aag ctg 336

Arg Arg Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gly Glu Leu Pro Thr Lys Leu
 100 105 110

aag gcc gag gat gtg tat atc acc gga gga tgt aac caa gcc ata gag 384
 Lys Ala Glu Asp Val Tyr Ile Thr Gly Gly Cys Asn Gln Ala Ile Glu
 115 120 125

atc gtg ata gat tct ctt gcc gga aat cca tcc acc aac att cta ctt 432
 Ile Val Ile Asp Ser Leu Ala Gly Asn Pro Ser Thr Asn Ile Leu Leu
 130 135 140

cca agg ccg ggg tat cct cac tac gat gct cgt gct tat agc ggc 480
 Pro Arg Pro Gly Tyr Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Val Tyr Ser Gly
 145 150 155 160

ctc gag att cgc gaa tac gat ctt ctc ccc gag agt gat tgg gaa atc 528
 Leu Glu Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Asp Trp Glu Ile
 165 170 175

aat ctc gat ggc ctc gag gcg gct gcg gat gag aat acc gtc gca atg 576
 Asn Leu Asp Gly Leu Glu Ala Ala Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Met
 180 185 190

gta atc atc aac ccc aac aat cca tgt gga aac gtc tac acc tac gac 624
 Val Ile Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Thr Tyr Asp
 195 200 205

cat ctc aac aag gtc gcg gag atg gct aga aaa ctc ggt ata atg ata 672
 His Leu Asn Lys Val Ala Glu Met Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Ile
 210 215 220

ata tcc gac gaa gta tat gat cat gtt gta tat gga gac aag cct ttt 720
 Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp His Val Val Tyr Gly Asp Lys Pro Phe
 225 230 235 240

att ccc atg ggg aag ttt gca tca ata gct ccg gtg atc acg ctc gga 768
 Ile Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Ala Pro Val Ile Thr Leu Gly
 245 250 255

tcc ata tcc aaa gga tgg gtc aac cca ggc tgg aga gtt ggc tgg atc 816
 Ser Ile Ser Lys Gly Trp Val Asn Pro Gly Trp Arg Val Gly Trp Ile
 260 265 270

gcc atg aac gat cct aat ggt atc ttt gta tct aca ggg gta gtt caa 864
 Ala Met Asn Asp Pro Asn Gly Ile Phe Val Ser Thr Gly Val Val Gln
 275 280 285

gca ata gag gat ttt ctt gat tta act cca cag cct tca ttt att ctc 912
 Ala Ile Glu Asp Phe Leu Asp Leu Thr Pro Gln Pro Ser Phe Ile Leu
 290 295 300

cag gaa gca ctt cct gat ata ttg gag aaa aca cct aaa gag ttc ttc	305	310	315	320	960
Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe					
gag aag aag atc aaa gcc atg aga cgc aac gtc gag ctt tca tgt gag	325	330	335		1008
Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu					
agg ctc aag gat att cct tgt ctc ttt tgt ccc aag aaa ccc gaa tct	340	345	350		1056
Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser					
tgt tct tat tta tgg ttg aag ctt gac aca tca atg ttg aat aat atc	355	360	365		1104
Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile					
aaa aat gat ttt gat ttc tgc acg aag cta gtt agt gag gag agt ctt	370	375	380		1152
Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu					
atc ctt ata cca gga gtg gct cta ggg gca gag aat tgg gtg agg ata	385	390	395	400	1200
Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile					
tcg ata gga acc gac gaa tca gtg gta caa gaa ata ttt gac aga cta	405	410	415		1248
Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu					
aaa ggt ttc tat gat cgt cat gcc atc tcc aag gaa gct atc aaa ctc	420	425	430		1296
Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu					
agt ggc cat gc c att aac cag atc gtc gtc tct gtc aa	435	440			1334
Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val					
<210> 8					
<211> 444					
<212> PRT					
<213> Arabidopsis thaliana					
<400> 8					
Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp	1	5	10	15	
Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu	20	25	30		

Arg Lys Leu Ala Phe Gly Met Phe Lys Asn Cys Thr Met Asn Ser Gly
35 40 45

Lys Thr Ile Leu Phe Pro Thr Pro Gly Glu Pro Ser Ala His Ser Asn
50 55 60

Phe Arg Thr Cys Pro Glu Ala Glu Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg
65 70 75 80

Ser Gly Met Ala Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Pro Gly Val Phe Lys Ala
85 90 95

Arg Arg Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gly Glu Leu Pro Thr Lys Leu
100 105 110

Lys Ala Glu Asp Val Tyr Ile Thr Gly Gly Cys Asn Gln Ala Ile Glu
115 120 125

Ile Val Ile Asp Ser Leu Ala Gly Asn Pro Ser Thr Asn Ile Leu Leu
130 135 140

Pro Arg Pro Gly Tyr Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Val Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Leu Glu Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Asp Trp Glu Ile
165 170 175

Asn Leu Asp Gly Leu Glu Ala Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Met
180 185 190

Val Ile Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Thr Tyr Asp
195 200 205

His Leu Asn Lys Val Ala Glu Met Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Ile
210 215 220

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp His Val Val Tyr Gly Asp Lys Pro Phe
225 230 235 240

Ile Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Ala Pro Val Ile Thr Leu Gly
245 250 255

Ser Ile Ser Lys Gly Trp Val Asn Pro Gly Trp Arg Val Gly Trp Ile
260 265 270

Ala Met Asn Asp Pro Asn Gly Ile Phe Val Ser Thr Gly Val Val Gln
275 280 285

Ala Ile Glu Asp Phe Leu Asp Leu Thr Pro Gln Pro Ser Phe Ile Leu
290 295 300

Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe
 305 310 315 320
 Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu
 325 330 335
 Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser
 340 345 350
 Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile
 355 360 365
 Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu
 370 375 380
 Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile
 385 390 395 400
 Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu
 405 410 415
 Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu
 420 425 430
 Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val
 435 440

<210> 9

<211> 1389

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1389)

<400> 9

atg agc gaa gaa caa caa cac gcc aat cta gcg gtt ccc gcg ttt aaa
 Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys
 1 5 10 15

act gag aaa gat ccc gta acg caa acg caa aat ggt caa agt agc gtt
 Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val
 20 25 30

tgg cgt ttc ggt gga agt gat aag gca gcg aaa gca tcc acc gta acg
 Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr
 35 40 45

48

96

144

ctt aga ggt gtc atc tac atg ctc ttc gac aac tgc agc aaa gac gtc Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val	50	55	60	192
aat aag acc att tta ccc ctc ggc cac ggt gac cct tcc gtc tac cct Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro	65	70	75	240
tgc ttc cgt acc tgt atc gaa gct gaa gac gcc gtc gtc gac gtc ctt Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu	85	90	95	288
cgc tcc ggc aaa ggc aat tct tac ggt ccc gga gct ggg att ctc ccc Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro	100	105	110	336
gca aga cga gcc gtt gct gat tat atg aac cga gat ctt ccg cac aag Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys	115	120	125	384
tta acg ccc gaa gat att ttt ctg acc gct gga tgc aac caa ggg ata Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile	130	135	140	432
gag atc gtg ttc gaa tcg ttg gct cga cca aac gca aac atc ttg ctc Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu	145	150	155	480
cca cgt cct ggc ttc cct cat tac gac gct cgt gct gct tac agt ggt Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly	165	170	175	528
ctc gag gtt cgc aag ttt gat ctt ctt ccc gag aaa gaa tgg gag att Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile	180	185	190	576
gat ctt gaa ggt atc gaa gcc att gca gac gag aaa act gtg gct atg Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Ala Met	195	200	205	624
gtt gta att aac ccc aac aat ccc tgt gga aat gtc tac tct cac gac Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp	210	215	220	672
cat ctc aaa aag gtt gca gag acg gct agg aag ctc ggg ata atg gtg His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val	225	230	235	720
atc tca gac gaa gta tat gac cga act ata ttc gga gac aat cca ttt				240
				768

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe			
245	250	255	
gtt cca atg ggg aag ttt gct tcg ata gtc cct gta ttg aca cta gca			816
Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala			
260	265	270	
ggc ata tct aag gga tgg gtt cct gga tgg aaa att ggc tgg att			864
Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile			
275	280	285	
gcc ttg aat gat ccc gag ggc gtt ttc gag acc acc aag gtg tta caa			912
Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln			
290	295	300	
tcc atc aaa cag aat ctt gac gta act cct gac cct gcc aca ata att			960
Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile			
305	310	315	320
cag gct gca ctt cca gcg atc ctg gag aaa gcg gac aaa aac ttc ttt			1008
Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe			
325	330	335	
gca aag aag aac aag ata ctc aaa cat aat gtt gat ttg gtg tgt gat			1056
Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp			
340	345	350	
agg ctc aag gac atc ccc tgt gtc gtc tgt ccc aag aaa cct gag tct			1104
Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser			
355	360	365	
tgc act tac tta ttg aca aag ttg gag ctg tca ctg atg gat aat atc			1152
Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile			
370	375	380	
aag gac gat ata gat ttt tgc gta aaa ctg gcc aga gag gag aat ctc			1200
Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu			
385	390	395	400
gtg ttt cta cca ggg gat gct ctg ggt ttg aag aac tgg acg agg ata			1248
Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile			
405	410	415	
acc atc gga gtc gaa gct cat atg ctt gag gat gca ctt gag aga ctg			1296
Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu			
420	425	430	
aag ggt ttc tgt aca cgt cat gcc aag aag aca gag aca gaa act gag			1344
Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu			
435	440	445	

tca ctt caa gct ttg aaa ctg agt gat aat aat ctc gaa atg taa 1389
 Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met
 450 455 460

<210> 10
<211> 462
<212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 10
Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys
1 5 10 15

Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val
20 25 30

Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr
35 40 45

Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val
50 55 60

Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro
65 70 75 80

Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu
85 90 95

Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro
 100 105 110

Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys
115 120 125

Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile
130 135 140

Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu
145 150 155 160

Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly
165 170 175

Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile
 180 185 190

Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Val Ala Met
195 200 205

Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp
210 215 220

His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val
225 230 235 240

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe
245 250 255

Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala
260 265 270

Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile
275 280 285

Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln
290 295 300

Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile
305 310 315 320

Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe
325 330 335

Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp
340 345 350

Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Pro Glu Ser
355 360 365

Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile
370 375 380

Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu
385 390 395 400

Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile
405 410 415

Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu
420 425 430

Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu
435 440 445

Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met
450 455 460

<210> 11

<211> 1243

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1242)

<400> 11

atg gag aat gga gca acg acg acg aca att acc atc aaa ggg att 48
 Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile
 1 5 10 15

ctg agt ttg cta atg gaa agc atc aca aca gag gaa gat gaa gga gga 96
 Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly
 20 25 30

aag aga gta ata tct ctg gga atg gga gac cca aca ctc tac tcg tgt 144
 Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys
 35 40 45

ttt cgt aca aca caa gtc tct ctt caa gct gtt tct gat tct ctt ctc 192
 Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu
 50 55 60

tcc aac aag ttc cat ggt tac tct cct acc gtc ggt ctt ccc caa gct 240
 Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala
 65 70 75 80

cga agg gca ata gca gag tat cta tcg cgt gat ctt cca tac aaa ctt 288
 Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu
 85 90 95

tca cag gat gat gtg ttt atc aca tcg ggt tgc acg caa gcg atc gat 336
 Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp
 100 105 110

gta gca ttg tcg atg tta gct cgt ccc agg gct aat ata ctt ctt cca 384
 Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro
 115 120 125

agg cct ggt ttc cca atc tat gaa ctc tgt gct aag ttt aga cac ctt 432
 Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu
 130 135 140

gaa gtt cgc tac gtc gat ctt ctt ccg gaa aat gga tgg gag atc gat 480
 Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp
 145 150 155 160

ctt gat gct gtc gag gct ctt gca gac gaa aac acg gtt gct ttg gtt 528
 Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val
 165 170 175

 gtt ata aac cct ggt aat cct tgc ggg aat gtc tat agc tac cag cat 576
 Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His
 180 185 190

 ttg atg aag att gcg gaa tcg gcg aaa aaa cta ggg ttt ctt gtg att 624
 Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile
 195 200 205

 gct gat gag gtt tac ggt cat ctt gct ttt ggt agc aaa ccg ttt gtg 672
 Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val
 210 215 220

 cca atg ggt gtg ttt gga tct att gtt cct gtg ctt act ctt ggc tct 720
 Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser
 225 230 235 240

 tta tca aag aga tgg ata gtt cca ggt tgg cga ctc ggg tgg ttt gtc 768
 Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val
 245 250 255

 acc act gat cct tct ggt tcc ttt aag gac cct aag atc att gag agg 816
 Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg
 260 265 270

 ttt aag aaa tac ttt gat att ctt ggt gga cca gct aca ttt att cag 864
 Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln
 275 280 285

 gct gca gtt ccc act att ttg gaa cag acg gat gag tct ttc ttc aag 912
 Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys
 290 295 300

 aaa acc ttg aac tcg ttg aag aac tct tcg gat att tgt tgt gac tgg 960
 Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp
 305 310 315 320

 atc aag gag att cct tgc att gat tcc tcg cat cga cca gaa gga tcc 1008
 Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser
 325 330 335

 atg gca atg atg gtc aag ctg aat ctc tca tta ctt gaa gat gta agt 1056
 Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser
 340 345 350

 gac gat atc gac ttc tgt ttc aag tta gct agg gaa gaa tca gtc atc 1104
 Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile

355	360	365	
ctt ctt cct ggt acc gcg gtg ggg ctg aag aac tgg ctg agg ata acg Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr			1152
370	375	380	
ttt gca gca gat gca act tcg att gaa gaa gct ttt aaa agg atc aaa Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys			1200
385	390	395	400
tgt ttc tat ctt aga cat gcc aag act caa tat cca acc ata t Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile			1243
405		410	
<210> 12			
<211> 414			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 12			
Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile			
1	5	10	15
Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly			
20	25	30	
Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys			
35	40	45	
Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu			
50	55	60	
Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala			
65	70	75	80
Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu			
85	90	95	
Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp			
100	105	110	
Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro			
115	120	125	
Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu			
130	135	140	
Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp			
145	150	155	160

Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val
165 170 175

Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His
180 185 190

Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile
195 200 205

Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val
210 215 220

Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser
225 230 235 240

Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val
245 250 255

Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg
260 265 270

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln
275 280 285

Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys
290 295 300

Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp
305 310 315 320

Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser
325 330 335

Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser
340 345 350

Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile
355 360 365

Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr
370 375 380

Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys
385 390 395 400

Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile
405 410

<210> 13
<211> 1338
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 13 atg ggc cac caa aac gcc gcc gtt tca gag aat caa aac cat gat gac 48
Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
1 5 10 15

ggc gct gcg tcg tcg ccg gga ttc aag ctc gtc gga ttt tcc aag ttc 96
Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
20 25 30

gta aga aag aat cca aag tct gat aaa ttc aag gtt aag cgc ttc cat 144
 Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
 35 40 45

cac atc gag ttc tgg tgc ggc gac gca acc aac gtc gct cgt cgc ttc 192
 His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
 50 55 60

tcc tgg ggt ctg ggg atg aga ttc tcc gcc aaa tcc gat ctt tcc acc 240
 Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
 65 70 75 80

gga aac atg gtt cac gcc tct tac cta ctc acc tcc ggt gac ctc cga 288
 Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
 85 90 95

ttc ctt ttc act gct cct tac tct ccg tct ctc tcc gcc gga gag att 336
 Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
 100 105 110

aaa ccg aca acc aca gct tct atc cca agt ttc gat cac ggc tct tgt 384
 Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
 115 120 125

cgt tcc ttc ttc tct tca cat ggt ctc ggt gtt aga gcc gtt gcg att 432
Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
130 135 140

gaa gta gaa gac gca gag tca gct ttc tcc atc agt gta gct aat ggc 480
 Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160

gct att cct tcg tcg cct cct atc gtc ctc aat gaa gca gtt acg atc 528
 Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile
 165 170 175

gct gag gtt aaa cta tac ggc gat gtt gtt ctc cga tat gtt agt tac 576
 Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr
 180 185 190

aaa gca gaa gat acc gaa aaa tcc gaa ttc ttg cca ggg ttc gag cgt 624
 Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg
 195 200 205

gta gag gat gcg tcg tcg ttc cca ttg gat tat ggt atc cgg cgg ctt 672
 Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu
 210 215 220

gac cac gcc gtg gga aac gtt cct gag ctt ggt ccg gct tta act tat 720
 Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr
 225 230 235 240

gta gcg ggg ttc act ggt ttt cac caa ttc gca gag ttc aca gca gac 768
 Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp
 245 250 255

gac gtt gga acc gcc gag agc ggt tta aat tca gcg gtc ctg gct agc 816
 Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser
 260 265 270

aat gat gaa atg gtt ctt cta ccg att aac gag cca gtg cac gga aca 864
 Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr
 275 280 285

aag agg aag agt cag att cag acg tat ttg gaa cat aac gaa ggc gca 912
 Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala
 290 295 300

ggg cta caa cat ctg gct ctg atg agt gaa gac ata ttc agg acc ctg 960
 Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu
 305 310 315 320

aga gag atg agg aag agg agc agt att gga gga ttc gac ttc atg cct 1008
 Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro
 325 330 335

tct cct ccg cct act tac tac cag aat ctc aag aaa cgg gtc ggc gac 1056
 Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp
 340 345 350

gtg ctc agc gat gat cag atc aag gag tgt gag gaa tta ggg att ctt 1104
 Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu

355	360	365	
gta gac aga gat gat caa ggg acg ttg ctt caa atc ttc aca aaa cca Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro			1152
370	375	380	
cta ggt gac agg ccg acg ata ttt ata gag ata atc cag aga gta gga Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly			1200
385	390	395	400
tgc atg atg aaa gat gag gaa ggg aag gct tac cag agt gga gga tgt Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys			1248
405	410	415	
ggt ggt ttt ggc aaa ggc aat ttc tct gag ctc ttc aag tcc att gaa Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu			1296
420	425	430	
gaa tac gaa aag act ctt gaa gcc aaa cag tta gtg gga tga Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly			1338
435	440	445	
<210> 14			
<211> 445.			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 14			
Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp			
1	5	10	15
Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe			
20	25	30	
Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His			
35	40	45	
His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe			
50	55	60	
Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr			
65	70	75	80
Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg			
85	90	95	
Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile			
100	105	110	

Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
130 135 140

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
145 150 155 160

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile
165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr
180 185 190

Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg
195 200 205

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu
210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr
225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp
245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser
260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr
275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala
290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu
305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro
325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp
340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu
355 360 365

Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
370 375 380

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly
 385 390 395 400

Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys
 405 410 415

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu
 420 425 430

Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
 435 440 445

<210> 15

<211> 1182

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1182)

<400> 15

atg gag tct ctg ctc tct agt tct tct ctt gtt tcc gct gct ggt ggg 48
 Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly
 1 5 10 15

ttt tgt tgg aag aag cag aat cta aag ctc cac tct tta tca gaa atc 96
 Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile
 20 25 30

cga gtt ctg cgt tgt gat tcg agt aaa gtt gtc gca aaa ccg aag ttt 144
 Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe
 35 40 45

agg aac aat ctt gtt agg cct gat ggt caa gga tct tca ttg ttg ttg 192
 Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu
 50 55 60

tat cca aaa cat aag tcg aga ttt cgg gtt aat gcc act gcg ggt cag 240
 Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln
 65 70 75 80

ccc gag gct ttc gac tcg aat agc aaa cag aag tct ttt aga gac tcg 288
 Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser
 85 90 95

tta gat gcg ttt tac agg ttt tct agg cct cat aca gtt att ggc aca 336
 Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100

105

110

gtg ctt agc att tta tct gta tct ttc tta gca gta gag aag gtt tct 384
 Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser
 115 120 125

gat ata tct cct tta ctt ttc act ggc atc ttg gag gct gtt gtt gca 432
 Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala
 130 135 140

gct ctc atg atg aac att tac ata gtt ggg cta aat cag ttg tct gat 480
Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp
145 150 155 160

gtt gaa ata gat aag gtt aac aag ccc tat ctt cca ttg gca tca gga 528
 Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly
 165 170 175

gaa tat tct gtt aac acc ggc att gca ata gta gct tcc ttc tcc atc 576
 Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile
 180 185 190

atg agt ttc tgg ctt ggg tgg att gtt ggt tca tgg cca ttg ttc tgg 624
Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp
195 200 205

gct ctt ttt gtg agt ttc atg ctc ggt act gca tac tct atc aat ttg 672
Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu
210 215 220

cca ctt tta cg^g tgg aaa aga ttt gca ttg gtt gca gca atg tgt atc 720
 Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile
 225 230 235 240

ctc gct gtc cga gct att att gtt caa atc gcc ttt tat cta cat att 768
Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile
245 250 255

cag aca cat gtg ttt gga aga cca atc ttg ttc act agg cct ctt att 816
Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile
260 265 270

ttc gcc act gcg ttt atg agc ttt ttc tct gtc gtt att gca ttg ttt 864
Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe
275 280 285

aag gat ata cct gat atc gaa ggg gat aag ata ttc gga atc cga tca 912
Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser
290 295 300

ttc tct gta act ctg ggt cag aaa cgg gtg ttt tgg aca tgt gtt aca 960
 Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr
 305 310 315 320

cta ctt caa atg gct tac gct gca att cta gtt gga gcc aca tct 1008
 Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser
 325 330 335

cca ttc ata tgg agc aaa gtc atc tcg gtt gtg ggt cat gtt ata ctc 1056
 Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu
 340 345 350

gca aca act ttg tgg gct cga gct aag tcc gtt gat ctg agt agc aaa 1104
 Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys
 355 360 365

acc gaa ata act tca tgt tat atg ttc ata tgg aag ctc ttt tat gca 1152
 Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala
 370 375 380

gag tac ttg ctg tta cct ttt ttg aag tga 1182
 Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys
 385 390

<210> 16

<211> 393

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 16

Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile
 20 25 30

Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe
 35 40 45

Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu
 50 55 60

Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser
 85 90 95

Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100 105 110

Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser
115 120 125

Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala
130 135 140

Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp
145 150 155 160

Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly
165 170 175

Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile
180 185 190

Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp
195 200 205

Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu
210 215 220

Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile
225 230 235 240

Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile
245 250 255

Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile
260 265 270

Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe
275 280 285

Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser
290 295 300

Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr
305 310 315 320

Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser
325 330 335

Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu
340 345 350

Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys
355 360 365

Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala
370 375 380

Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys
385 390

<210> 17
<211> 1509
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1395)

<400> 17
atg gct tcc att gct ctc aaa act ttc acc ggc ctc cgt caa tcc tcg 48
Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser
1 5 10 15

ccg gaa aac aat tcc att act ctt tct aaa tcc ctc ccc ttc acc caa 96
 Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln
 20 25 30

aac ggc cgc aat ctt cgt gtt gcg gtg gtg ggc ggt ggt cct gct ggt 192
Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly
50 55 60

ggc gcc gcc gct gaa aca ctc gcc aag gga gga att gaa acc ttc tta 240
 Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu
 65 70 75 80

atc gaa cgc aaa atg gac aac tgc aaa ccc tgc ggt ggg gcc atc cca 288
 Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro
 85 90 95

ctt tgc atg gtg gga gaa ttt gac ctc cct ttg gat atc att gac cg 336
 Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg
 100 105 110

aaa gtt aca aag atg aag atg att tcc cca tcc aac gtt gct gtt gat 384
Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp
115 120 125

att ggt cag act tta aag cct cac gag tac atc ggt atg gtg cgc cgc 432

Ile Gly Gln Thr Leu Lys Pro His Glu Tyr Ile Gly Met Val Arg Arg			
130	135	140	
gaa gta ctc gat gct tac ctc cgt gac cgc gct gct gaa gcc gga gcc 480			
Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala			
145	150	155	160
tct gtt ctc aac ggc ttg ttc ctc aaa atg gac atg ccc aaa gct ccc 528			
Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro			
165	170	175	
aac gca cct tac gtc ctt cac tac aca gct tac gac tcc aaa act aat 576			
Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn			
180	185	190	
ggc gcg ggg gag aag cgt acc ctg gaa gtt gac gcc gtt atc ggc gct 624			
Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala			
195	200	205	
gac ggt gca aat tcc cgt gtc gca aaa tcc ata aac gcc ggt gac tac 672			
Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr			
210	215	220	
gag tac gct att gca ttc caa gaa agg att aaa att tcc gat gat aaa 720			
Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys			
225	230	235	240
atg aag tat tac gag aat tta gct gaa atg tac gtg ggt gat gac gtg 768			
Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val			
245	250	255	
tcc cct gat ttt tac ggg tgg gtt ttc ccc aaa tgt gac cac gtt gcc 816			
Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala			
260	265	270	
gtt ggc act ggc aca gtc acc cac aaa gct gac atc aaa aaa ttc cag 864			
Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln			
275	280	285	
cta gct aca aga ttg aga gct gat tcc aaa atc acc ggc gga aaa att 912			
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile			
290	295	300	
atc cgg gtc gag gcc cac ccg att cca gaa cac cca aga ccc aga aga 960			
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg			
305	310	315	320
tta caa gac aga gtt gca ttg gtt ggt gat gcg gca ggg tac gtg acc 1008			
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr			
325	330	335	

aaa tgt tcg ggc gaa ggg att tac ttc gcg gca aag agt gga cgt atg 1056
 Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met
 340 345 350

 tgt gct gaa gca att gtt gaa ggg tca gaa atg gga aaa aga atg gtg 1104
 Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val
 355 360 365

 gac gag agt gat ttg agg aag tat ttg gag aaa tgg gac aag act tat 1152
 Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr
 370 375 380

 tgg cca acg tac aag gtg ctt gat ata ttg cag aag gta ttt tac agg 1200
 Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg
 385 390 395 400

 tcg aat ccg gcg agg gaa gca ttt gtt gaa atg tgc gca gat gag tat 1248
 Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr
 405 410 415

 gtg cag aag atg aca ttt gac agc tat ttg tac aag aaa gta gca cca 1296
 Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro
 420 425 430

 gga aac cca att gaa gac ttg aag ctt gct gtg aat acc att gga agt 1344
 Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser
 435 440 445

 ttg gtg aga gct aat gca cta aga agg gaa atg gac aag ctc agt gta 1392
 Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val
 450 455 460

 taa gaagattaac agcattaata tttcttgta attgaaggat ttatctca 1445
 465

 aattactctg taaaacacctt tcatcctgcc ttaatcgga tttatgtAAC ttcataattt 1505

 gagc 1509

<210> 18
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 18
 Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser
 1 5 10 15

Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln
 20 25 30

Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val
 35 40 45

Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly
 50 55 60

Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu
 65 70 75 80

Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro
 85 90 95

Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg
 100 105 110

Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp
 115 120 125

Ile Gly Gln Thr Leu Lys Pro His Glu Tyr Ile Gly Met Val Arg Arg
 130 135 140

Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala
 145 150 155 160

Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro
 165 170 175

Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn
 180 185 190

Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala
 195 200 205

Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr
 210 215 220

Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys
 225 230 235 240

Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val
 245 250 255

Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala
 260 265 270

Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln

275	280	285
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile		
290	295	300
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg		
305	310	315
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr		
325	330	335
Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met		
340	345	350
Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val		
355	360	365
Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr		
370	375	380
Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg		
385	390	395
Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr		
405	410	415
Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro		
420	425	430
Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser		
435	440	445
Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val		
450	455	460

<210> 19
<211> 957
<212> DNA
<213> Synechocystis PCC6803

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(957)

<400> 19
atg ccc gag tat ttg ctt ctg ccc gct ggc cta att tcc ctc tcc ctg 48
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu
1 5 10 15

gcg atc gcc gct gga ctg tat ctc cta act gcc cggttat cag tca 96
 Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser
 20 25 30

tcg gat tcc gtg gcc aac gcc tac gac caa tgg aca gag gac ggc att 144
 Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile
 35 40 45

ttg gaa tat tac tgg ggc gac cat atc cac ctc ggc cat tat ggc gat 192
 Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp
 50 55 60

ccg cca gtg gcc aag gat ttc atc caa tcg aaa att gat ttt gtc cat 240
 Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His
 65 70 75 80

gcc atg gcc cag tgg ggc gga tta gat aca ctt ccc ccc ggc aca acg 288
 Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr
 85 90 95

gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att ctc gcc 336
 Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala
 100 105 110

aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc caa cag 384
 Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln
 115 120 125

gtg aaa cggtcgac gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc aag ttt 432
 Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe
 130 135 140

gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt ttc gac 480
 Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp
 145 150 155 160

gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa gct gtg 528
 Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val
 165 170 175

ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att ctg gtg 576
 Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val
 180 185 190

gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc aac ttc 624
 Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe
 195 200 205

tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc cac cct 672
 Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro

41

210	215	220	
gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc acg ggt Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly			720
225	230	235	240
ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg acc ctc Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu			768
245	250	255	
ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc ccg ccc cag ggc Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly			816
260	265	270	
tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg ccg gaa gta Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val			864
275	280	285	
ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt tgt cgc Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg			912
290	295	300	
ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc actcaa gct taa Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala			957
305	310	315	
<210> 20			
<211> 318			
<212> PRT			
<213> Synechocystis PCC6803			
<400> 20			
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu			
1	5	10	15
Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser			
20	25	30	
Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile			
35	40	45	
Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp			
50	55	60	
Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His			
65	70	75	80
Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr			
85	90	95	

Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala
100 105 110

Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln
115 120 125

Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe
130 135 140

Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp
145 150 155 160

Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val
165 170 175

Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val
180 185 190

Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe
195 200 205

Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro
210 215 220

Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly
225 230 235 240

Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu
245 250 255

Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly
260 265 270

Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val
275 280 285

Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg
290 295 300

Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala
305 310 315

<210> 21

<211> 1100

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1092)

<400> 21

atg aaa ttt ccg ccc cac agt ggt tac cat tgg caa ggt caa tca cct 48
 Met Lys Phe Pro Pro His Ser Gly Tyr His Trp Gln Gly Gln Ser Pro
 1 5 10 15

tcc ttt gaa ggt tgg tac gtg cgc ctg ctt ttg ccc caa tcc ggg gaa 96
 Phe Phe Glu Gly Trp Tyr Val Arg Leu Leu Leu Pro Gln Ser Gly Glu
 20 25 30

agt ttt gct ttt atg tac tcc atc gaa aat cct gct agc gat cat cat 144
 Ser Phe Ala Phe Met Tyr Ser Ile Glu Asn Pro Ala Ser Asp His His
 35 40 45

tac ggc ggc ggt gct gtg caa att tta ggg ccg gct acg aaa aaa caa 192
 Tyr Gly Gly Ala Val Gln Ile Leu Gly Pro Ala Thr Lys Lys Gln
 50 55 60

gaa aat cag gaa gac caa ctt gtt tgg ccg aca ttt ccc tcg gta aaa 240
 Glu Asn Gln Glu Asp Gln Leu Val Trp Arg Thr Phe Pro Ser Val Lys
 65 70 75 80

aaa ttt tgg gcc agt cct cgc cag ttt gcc cta ggg cat tgg gga aaa 288
 Lys Phe Trp Ala Ser Pro Arg Gln Phe Ala Leu Gly His Trp Gly Lys
 85 90 95

tgt agg gat aac agg cag gcg aaa ccc cta ctc tcc gaa ttt ttt 336
 Cys Arg Asp Asn Arg Gln Ala Lys Pro Leu Leu Ser Glu Glu Phe Phe
 100 105 110

gcc acg gtc aag gaa ggt tat caa atc cat caa aat cag cac caa gga 384
 Ala Thr Val Lys Glu Gly Tyr Gln Ile His Gln Asn Gln His Gln Gly
 115 120 125

caa atc att cat ggc gat cgc cat tgt cgt tgg cag ttc acc gta gaa 432
 Gln Ile Ile His Gly Asp Arg His Cys Arg Trp Gln Phe Thr Val Glu
 130 135 140

ccg gaa gta act tgg ggg agt cct aac cga ttt cct ccg gct aca gcg 480
 Pro Glu Val Thr Trp Gly Ser Pro Asn Arg Phe Pro Arg Ala Thr Ala
 145 150 155 160

ggg tgg ctt tcc ttt tta ccc ttg ttt gat ccc ggt tgg caa att ctt 528
 Gly Trp Leu Ser Phe Leu Pro Leu Phe Asp Pro Gly Trp Gln Ile Leu
 165 170 175

tta gcc caa ggt aga gcg cac ggc tgg ctg aaa tgg cag agg gaa cag 576
 Leu Ala Gln Gly Arg Ala His Gly Trp Leu Lys Trp Gln Arg Glu Gln

180

185

190

tat gaa ttt gac cac gcc cta gtt tat gcc gaa aaa aat tgg ggt cac 624
 Tyr Glu Phe Asp His Ala Leu Val Tyr Ala Glu Lys Asn Trp Gly His
 195 200 205

tcc ttt ccc tcc cgc tgg ttt tgg ctc caa gca aat tat ttt cct gac 672
 Ser Phe Pro Ser Arg Trp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Tyr Phe Pro Asp
 210 215 220

cat cca gga ctg agc gtc act gcc gct ggc ggg gaa cgg att gtt ctt 720
 His Pro Gly Leu Ser Val Thr Ala Ala Gly Gly Glu Arg Ile Val Leu
 225 230 235 240

ggt cgc ccc gaa gag gta gct tta att ggc tta cat cac caa ggt aat 768
 Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Leu His His Gln Gly Asn
 245 250 255

ttt tac gaa ttt ggc ccg ggc cat ggc aca gtc act tgg caa gta gct 816
 Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala
 260 265 270

ccc tgg ggc cgt tgg caa tta aaa gcc agc aat gat agg tat tgg gtc 864
 Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val
 275 280 285

aag ttg tcc gga aaa aca gat aaa aaa ggc agt tta gtc cac act ccc 912
 Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro
 290 295 300

acc gcc cag ggc tta caa ctc aac tgc cga gat acc act agg ggc tat 960
 Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr
 305 310 315 320

ttg tat ttg caa ttg gga tct gtg ggt cac ggc ctg ata gtg caa ggg 1008
 Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly
 325 330 335

gaa acg gac acc gcg ggg cta gaa gtt gga ggt gat tgg ggt tta aca 1056
 Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr
 340 345 350

gag gaa aat ttg agc aaa aaa aca gtg cca ttc tga ggaaataa 1100
 Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe
 355 360

<210> 22

<211> 363

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 22

Met Lys Phe Pro Pro His Ser Gly Tyr His Trp Gln Gly Gln Ser Pro			
1	5	10	15

Phe Phe Glu Gly Trp Tyr Val Arg Leu Leu Leu Pro Gln Ser Gly Glu			
20	25	30	

Ser Phe Ala Phe Met Tyr Ser Ile Glu Asn Pro Ala Ser Asp His His			
35	40	45	

Tyr Gly Gly Ala Val Gln Ile Leu Gly Pro Ala Thr Lys Lys Gln			
50	55	60	

Glu Asn Gln Glu Asp Gln Leu Val Trp Arg Thr Phe Pro Ser Val Lys			
65	70	75	80

Lys Phe Trp Ala Ser Pro Arg Gln Phe Ala Leu Gly His Trp Gly Lys			
85	90	95	

Cys Arg Asp Asn Arg Gln Ala Lys Pro Leu Leu Ser Glu Glu Phe Phe			
100	105	110	

Ala Thr Val Lys Glu Gly Tyr Gln Ile His Gln Asn Gln His Gln Gly			
115	120	125	

Gln Ile Ile His Gly Asp Arg His Cys Arg Trp Gln Phe Thr Val Glu			
130	135	140	

Pro Glu Val Thr Trp Gly Ser Pro Asn Arg Phe Pro Arg Ala Thr Ala			
145	150	155	160

Gly Trp Leu Ser Phe Leu Pro Leu Phe Asp Pro Gly Trp Gln Ile Leu			
165	170	175	

Leu Ala Gln Gly Arg Ala His Gly Trp Leu Lys Trp Gln Arg Glu Gln			
180	185	190	

Tyr Glu Phe Asp His Ala Leu Val Tyr Ala Glu Lys Asn Trp Gly His			
195	200	205	

Ser Phe Pro Ser Arg Trp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Tyr Phe Pro Asp			
210	215	220	

His Pro Gly Leu Ser Val Thr Ala Ala Gly Gly Glu Arg Ile Val Leu			
225	230	235	240

Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Leu His His Gln Gly Asn			
245	250	255	

Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala
 260 265 270

Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val
 275 280 285

Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro
 290 295 300

Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr
 305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly
 325 330 335

Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr
 340 345 350

Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe
 355 360

<210> 23

<211> 1047

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1047)

<400> 23

atg aaa gca act cta gca gca ccc tct tct ctc aca agc ctc cct tat 48
 Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr
 1 5 10 15

cga acc aac tct tct ttc ggc tca aag tca tcg ctt ctc ttt cgg tct 96
 Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser
 20 25 30

cca tcc tcc tcc tcc tca gtc tct atg acg aca acg cgt gga aac gtg 144
 Pro Ser Ser Ser Ser Val Met Thr Thr Arg Gly Asn Val
 35 40 45

gct gtg gcg gct gct aca tcc act gag gcg cta aga aaa gga ata 192
 Ala Val Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile
 50 55 60

gcg gag ttc tac aat gaa act tcg ggt ttg tgg gaa gag att tgg gga 240

Ala Glu Phe Tyr Asn Glu Thr Ser Gly Leu Trp Glu Glu Ile Trp Gly 80
 65 70 75 80

gat cat atg cat cat ggc ttt tgt gac cct gat tct tct gtt caa ctt 288
 Asp His Met His His Gly Phe Cys Asp Pro Asp Ser Ser Val Gln Leu
 85 90 95

tct gat tct ggt cac aag gaa gct cag atc cgt atg att gaa gag tct 336
 Ser Asp Ser Gly His Lys Glu Ala Gln Ile Arg Met Ile Glu Glu Ser
 100 105 110

ctc cgt ttt gcc ggt gtt act gat gaa gag gag gag aaa aag ata aag 384
 Leu Arg Phe Ala Gly Val Thr Asp Glu Glu Glu Lys Lys Ile Lys
 115 120 125

aaa gta gtg gat gtt ggg tgt ggg att gga gga agc tca aga tat ctt 432
 Lys Val Val Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Ser Ser Arg Tyr Leu
 130 135 140

gcc tct aaa ttt gga gct gaa tgc att ggc att act ctc agc cct gtt 480
 Ala Ser Lys Phe Gly Ala Glu Cys Ile Gly Ile Thr Leu Ser Pro Val
 145 150 155 160

cag gcc aag aga gcc aat gat ctc gcg gct gct caa tca ctc gct cat 528
 Gln Ala Lys Arg Ala Asn Asp Leu Ala Ala Gln Ser Leu Ala His
 165 170 175

aag gct tcc ttc caa gtt gcg gat gcg ttg gat cag cca ttc gaa gat 576
 Lys Ala Ser Phe Gln Val Ala Asp Ala Leu Asp Gln Pro Phe Glu Asp
 180 185 190

gga aaa ttc gat ata gtg tgg tcg atg gag agt ggt gag cat atg cct 624
 Gly Lys Phe Asp Ile Val Trp Ser Met Glu Ser Gly Glu His Met Pro
 195 200 205

gac aag gcc aag ttt gta aaa gag ttg gta cgt gtg gcg gct cca gga 672
 Asp Lys Ala Lys Phe Val Lys Glu Leu Val Arg Val Ala Ala Pro Gly
 210 215 220

ggt agg ata ata ata gtg aca tgg tgc cat aga aat cta tct gcg ggg 720
 Gly Arg Ile Ile Ile Val Thr Trp Cys His Arg Asn Leu Ser Ala Gly
 225 230 235 240

gag gaa gct ttg cag ccg tgg gag caa aac atc ttg gac aaa atc cgt 768
 Glu Glu Ala Leu Gln Pro Trp Glu Gln Asn Ile Leu Asp Lys Ile Arg
 245 250 255

aag acg ttc tat ctc ccg gct tgg tgc tcc acc gat gat tat gtc aac 816
 Lys Thr Phe Tyr Leu Pro Ala Trp Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Val Asn
 260 265 270

ttg ctt caa tcc cat tct ctc cag gat att aag tgt gcg gat tgg tca 864
 Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser
 275 280 285

gag aac gta gct cct ttc tgg cct gcg gtt ata cgg act gca tta aca 912
 Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr
 290 295 300

tgg aag ggc ctt gtg tct ctg ctt cgt agt ggt atg aaa agt att aaa 960
 Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys
 305 310 315 320

gga gca ttg aca atg cca ttg atg att gaa ggt tac aag aaa ggt gtc 1008
 Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val
 325 330 335

att aag ttt ggt atc atc act tgc cag aag cca ctc taa 1047
 Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu
 340 345

<210> 24

<211> 348

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr
 1 5 10 15

Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser
 20 25 30

Pro Ser Ser Ser Ser Val Ser Met Thr Thr Thr Arg Gly Asn Val
 35 40 45

Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Glu Phe Tyr Asn Glu Thr Ser Gly Leu Trp Glu Glu Ile Trp Gly
 65 70 75 80

Asp His Met His His Gly Phe Cys Asp Pro Asp Ser Ser Val Gln Leu
 85 90 95

Ser Asp Ser Gly His Lys Glu Ala Gln Ile Arg Met Ile Glu Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Phe Ala Gly Val Thr Asp Glu Glu Glu Lys Lys Ile Lys

115	120	125
Lys Val Val Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Tyr Leu		
130	135	140
Ala Ser Lys Phe Gly Ala Glu Cys Ile Gly Ile Thr Leu Ser Pro Val		
145	150	155
Gln Ala Lys Arg Ala Asn Asp Leu Ala Ala Gln Ser Leu Ala His		
165	170	175
Lys Ala Ser Phe Gln Val Ala Asp Ala Leu Asp Gln Pro Phe Glu Asp		
180	185	190
Gly Lys Phe Asp Ile Val Trp Ser Met Glu Ser Gly Glu His Met Pro		
195	200	205
Asp Lys Ala Lys Phe Val Lys Glu Leu Val Arg Val Ala Ala Pro Gly		
210	215	220
Gly Arg Ile Ile Ile Val Thr Trp Cys His Arg Asn Leu Ser Ala Gly		
225	230	235
Glu Glu Ala Leu Gln Pro Trp Glu Gln Asn Ile Leu Asp Lys Ile Arg		
245	250	255
Lys Thr Phe Tyr Leu Pro Ala Trp Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Val Asn		
260	265	270
Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser		
275	280	285
Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr		
290	295	300
Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys		
305	310	315
Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val		
325	330	335
Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu		
340	345	

<210> 25

<211> 580

<212> DNA

<213> Brassica napus

<220>

<221> misc_structure
<222> (1)..(580)

<400> 25

gtcgacgagc tcatggggcg aagggtcttg ctgcaccaag agatttctt gcaccaacgg 60

catggttga ggaagggcta cggcctgact acactattgt tcagaagttt ggcggtaac 120

tctttactgc taaacaagat ttctctccgt tcaatgtggt tgccctggcat ggcaattacg 180

tgccttataa gtatgacctg cacaagttct gtccatacaa cactgtcctt gtagaccatg 240

gagatccatc tgtaaataca gttctgacag caccaacgga taaacctggt gtggccttgc 300

ttgatttgt catattccct ctcgttggt tggttgctga gcataacctt cgacctcctt 360

actaccatcg taactgcattg agtgaattta tgggcctaattt ctatggtgct tacgaggcca 420

aagctgatgg atttctacct ggtggcgcaa gtcttcacag ttgtatgaca cctcatggtc 480

cagatacaac cacatacgag gcgacgattt ctcgtttaaa tgcaatggct ccttataagc 540

tcacaggcac catggccttc atgttgagg taccagtact 580

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>

<221> primer_bind
<222> (1)..(30)

<400> 26

gatatcatgg actcctacgt gattcagacg

30

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(29)

<400> 27
gatatcttat ttgtcacact ctcctggc

29

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)

<400> 28
gtcgacatgg caacccttaa gtgc

24

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(25)

<400> 29
gtcgacttac ttaacaccat tgacg

25

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 30

gtcgacatgg cgagcaacgg agtt

24

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 31

gtcgactcag ttgacagaga cgacg

25

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 32

ggatccgatc catgagcgaa gaacaaccac

30

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<400> 33

ggatcccttac atttcgagat tattatc

27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<400> 34

agatctatgg agaatggagc aacgacg

27

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(31)

<400> 35

agatctatat ggttggatat tgagtcttgg c

31

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 36

ggccgggcat ggcttccatt gctctc

26

<210> 37
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 37
gccccgggcgc tcaaattatg aagtta

26

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)

<400> 38
ggatccatgg gccaccaaaa cgcc

24

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 39
gtcgactcat cccactaact gtttgg

26

<210> 40
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 40
ggatccatgg agtctctgct ctcttag

26

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(32)

<400> 41
ccatggatcc tcacttcaaa aaaggtaaca gc

32

<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)

<400> 42
gatatcacca tggccgctgg actgttatctc c

31

<210> 43
<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 43

gtcgaccta agaatttaag cttgagtggc

30

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<400> 44

gatatcatgg aaatttccgc cccacag

27

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<400> 45

gatatccagt gttattccct cagaatgg

28

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 46
ggatccatga aagcaactct agcagc

26

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 47
gtcgacttag agtggcttct ggcaag

26

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)

<400> 48
gtcgacgagc tcatgggggc gaag

24

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 49

agtactggta cctcaaacat g

21

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 50

tctagactag aatccaaacctt ctg

23

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 51

tctagagctc gatcgagcgg ccgc

24

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 52
gccccgggcca aatttacaat tgccac

26

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(23)

<400> 53
gccccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 54
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial 'Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 54
gccccgggcat ctgtcgctc aaactc

26

<210> 55
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<400> 55

gccccgggctg ttgtcgcaaa attcgccc

28

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 56

gccccgggcat ctgtcgtctc aaactc

26

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 57

gccccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 58

gccccgggcct agaatccaac ttctg